

# Aspekte der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion im malignen Melanom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin – der  
Universität Regensburg



vorgelegt von  
Richard Bauer  
aus Hutthurm  
Juli 2005

Promotionsgesuch eingereicht am 13.Juli 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Witzgall

1. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Aslanidis

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Bosserhoff

3. Prüfer: Prof. Dr. A. Kurtz

## Liste der verwendeten Abkürzungen

Amp	Ampicillin
BSA	Rinder-Serumalbumin
CAM	cell adhesion molecule
Cdh	Cadherin
CDNA	copy DNA
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-related kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
H/120	120 kDa schweres Fibronektinfragment
HCR	highly conserved region, Promotorelement
HMG1	high mobility group 1, Transkriptionsfaktor
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEF/TCF	lymphoid enhancer factor/T cell factor
MAP	mitogen activated protein
MBP	myelin basic protein
MIA	melanoma inhibitory activity
MITF	microphthalmia associated transcription factor
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger-RNA

## Abkürzung

NTF	N-terminal fragment
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PAX3	paired box 3
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RGP	radial growth phase
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RTS	rapid translation system
SHC	Src homology collagen protein
SOX10	SRY-box containing gene 10
uPAR	urokinase plasminogen activated receptor
UpM	Umdrehungen pro Minute
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE	vascular endothelial
VGP	vertical growth phase
Wnt	Wingless and Int
50K	50 kDa schweres Fibronektinfragment

# Inhaltsangabe

<b>Liste der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>1</b>
<b>Inhaltsangabe</b>	<b>3</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Struktur und Aufbau der Haut</b>	<b>8</b>
2.1.1 Funktion der Melanozyten	9
<b>2.2 Das Maligne Melanom</b>	<b>10</b>
2.2.1 Das Melanom – Geschichtlicher Hintergrund	10
2.2.2 Mortalität und Inzidenz des malignen Melanoms	12
2.2.3 Proteine, die an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sind	12
<b>2.3 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle im malignen Melanom</b>	<b>17</b>
2.3.1 Cadherine	17
2.3.2 Die Rolle der klassischen Cadherine im malignen Melanom	19
<b>2.4 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle im malignen Melanom</b>	<b>21</b>
2.4.1 Integrine	21
2.4.2 Die Struktur der Integrine	22
2.4.2.1 Die extrazelluläre Domäne	23
2.4.2.2 Die zytoplasmatische Domäne	23
2.4.3 Die Rolle der Integrine im malignen Melanom	24
2.4.4 Die Integrinexpression in Melanozyten	25
2.4.5 Die Integrinexpression im malignen Melanom	25
<b>2.5 Die Adhäsion von Zellen</b>	<b>26</b>
2.5.1 Signalkaskaden, bei der Zell-Matrixadhäsion, ausgehend von Integrinen	26
2.5.2 Signalkaskaden bei der Zell-Zelladhäsion ausgehend von Cadherinen	32
<b>2.6 Das Protein MIA</b>	<b>33</b>
2.6.1 Die Rolle von MIA bei der Zelladhäsion im malignen Melanom	35
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Materialien</b>	<b>37</b>
3.1.1 Allgemeine Materialien	37
3.1.2 Geräte	39
3.1.3 Organismen	40
3.1.4 Säugerzelllinien	41
3.1.5 Oligonukleotide	41
3.1.6 Peptide	44

<b>3.2</b>	<b>Medien, Antibiotika und Puffer</b>	<b>45</b>
3.2.1	Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen	45
3.2.2	Antibiotika	45
3.2.3	Puffer und Lösungen	45
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>49</b>
3.3.1	Arbeiten mit Escherichia Coli	49
3.3.1.1	Kultivierung von Bakterien	49
3.3.1.2	Transformation von E.coli	49
3.3.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien	50
3.3.1.4	Isolierung von Plasmid DNA	50
3.3.1.5	Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midipräparation)	51
3.3.1.6	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.	51
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	51
3.3.2.1	DNA- und RNA Methoden	51
3.3.2.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	51
3.3.2.1.2	Gelelektrophorese von DNA	52
3.3.2.1.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	52
3.3.2.1.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	52
3.3.2.1.5	Reverse Transkription	52
3.3.2.1.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	53
3.3.2.1.7	3'RACE (rapid amplification of cDNA ends)	53
3.3.2.2	RNA-Methoden: RNA Isolierung aus Säugerzellen bzw humanen Geweben	53
3.3.2.3	Proteinchemische Methoden	53
3.3.2.3.1	Rekombinante zellfreie Herstellung von biotinyliertem MIA	53
3.3.2.3.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakten	54
3.3.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen	54
3.3.2.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	54
3.3.2.3.5	Western Blot	55
3.3.2.3.6	Proteindetektion auf Western-Blots	55
3.3.2.3.7	Silberfärbung im SDS Gel	57
3.3.2.3.8	ELISA	57
3.3.2.3.9	MAP-Kinase-Aktivitätsassay	58
3.3.2.3.10	Ko-Immunpräzipitation	58
3.3.2.3.11	Immunhistochemie	59
3.3.3	Zellkulturmethoden	59
3.3.3.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	59
3.3.3.2	Stabile und transiente Transfektion von Zellkulturzellen	59
3.3.3.3	Durchflußzytometrische Analyse von Zellen (FACS)	60

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen an einer verkürzten und sezernierten Form von P-Cadherin in Melanomzellen</b>	<b>61</b>
4.1.1	Suche nach Veränderungen bei Zelladhäsionsmolekülen während der Entstehung des malignen Melanoms	61
4.1.2	Analyse der P-Cadherinexpression in Melanomzelllinien	62
4.1.3	Sezernierung der verkürzten Form von P-Cadherin	64
4.1.4	Analyse der <i>in situ</i> Expression der 50 kDa Form von P-Cadherin	66
4.1.4.1	Analyse der P-Cadherinexpression in <i>tissue microarrays (TMA)</i>	68
4.1.5	Western Blot Analyse von P-Cadherin in Melanommetastasen	68
4.1.6	Analyse der genomischen P-Cadherinsequenz in Melanomzelllinien	69
4.1.7	Analyse der P-Cadherin mRNA in Melanomzelllinien	70
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung von spezifischen Bindungspartnern des Proteins MIA</b>	<b>72</b>
4.2.1	Expression von rekombinantem biotinyliertem MIA	72
4.2.2	MIA reduziert die MAP-Kinase Aktivität im malignen Melanom	75
4.2.3	MIA bindet an die Zelloberfläche	77
4.2.4	Identifikation von MIA- Bindungspartnern	79
4.2.5	MIA bindet direkt an alpha4 beta1 und alpha5 beta1	82
4.2.6	MIA inhibiert Integrinaktivität	84
4.2.7	Analyse der Interaktion zwischen MIA und Integrinen	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>Identifikation einer trunkierten Form von P-Cadherin im malignen Melanom</b>	<b>89</b>
<b>5.2</b>	<b>Regulation des MAP-Kinase Signalweges über MIA</b>	<b>96</b>
<b>5.3</b>	<b>Bindung von MIA an Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>139</b>

# 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob MIA, neben Wechselwirkungen mit Extrazellulärmatrixmolekülen, auch spezifisch mit Rezeptoren auf der Oberfläche von Melanomzellen interagieren kann. Zusätzlich sollte geklärt werden, um welche Rezeptoren es sich dabei handelt. Zur Verbesserung der Detektion von MIA wurde dieses biotinyliert. Die Herstellung des rekombinanten, biotinmarkierten Moleküls erfolgte in einem zellfreien, *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem auf *E.coli* Basis (RTS Roche). Das daraus gewonnene, biotinmarkierte Protein wurde für die gesamten Experimente verwendet. Die korrekte Faltung des Proteins konnte dadurch verifiziert werden, dass es möglich war, das biotinylierte MIA mittels Antikörper in einem bereits etablierten ELISA-Assay nachzuweisen. Durch zusätzliche funktionelle Assays, wie Zellmigrationsassay und Invasionsassay, konnte ebenfalls sichergestellt werden, dass die migrationshemmende Wirkung von MIA auf Zellen *in vitro*, auch nach dessen Biotinmarkierung, erhalten blieb. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MIA die Aktivität der MAP-Kinase ERK 1/2 vermindert. Zusätzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass MIA nicht nur an Extrazellulärmatrixproteine, sondern direkt spezifisch an die Fibronektinrezeptoren  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  binden kann. Weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise von MIA auf Integrine ergaben, dass MIA die Aktivierung der Integrine hemmen kann.

Im Rahmen eines weiteren Projekts stellte sich bei einer Untersuchung von Zell-Zelladhäsionsproteinen mittels Western Blot heraus, dass das klassische P-Cadherin in Melanomzellen in einer verkürzten, 50 kDa Form vorliegt. Dabei wurde gezeigt, dass die Verkürzung von P-Cadherin bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden kann. Mittels RT-PCR konnte demonstriert werden, dass in allen untersuchten Melanomzelllinien das 3'Ende der mRNA von P-Cadherin ab Exon 10 fehlte.

Mit einer 3'RACE PCR und einem Datenbankscreening, welches spezifisch für Spleißprodukte war, wurde ausgeschlossen, dass es sich bei der Verkürzung um alternatives Spleißen der mRNA handelte. Die Daten ließen auch den Rückschluss zu, dass es sich nicht um posttranslationale Prozessierung des Proteins handeln konnte. Publikationen über diverse fragile Stellen an der P-



Cadherin Chromosomenstelle 16q22.1 führten zur Vermutung, dass die Verkürzung von P-Cadherin von einer Translokation an dieser Stelle im Chromosom herrühren muss. In weiteren Versuchen konnte zudem dargestellt werden, dass die verkürzte Form von P-Cadherin in Melanomzellen, im Gegensatz zur Wildtypisoform, nicht in der Membran der Zellen verankert ist, sondern in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Mittels eines *tissue microarrays* konnte der membranständige und zytoplasmatische Verlust von P-Cadherin mit zunehmender Tumordicke und zunehmendem Clark Level bestätigt werden.

MIA wurde in vorliegender Arbeit eine aktive Rolle in der spezifischen Hemmung der Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 zugewiesen. Das in Melanomzellen trunkierte und sezernierte P-Cadherin kann durch homophile Interaktion mit membranständigem Volllänge-P-Cadherin benachbarter Zellen die Ausbildung normaler Zell-Zell-Kontakte möglicherweise verhindern. Dadurch ist es entarteten Zellen potentiell möglich, sich leichter aus dem organisierten Gefüge des Gewebes zu lösen.

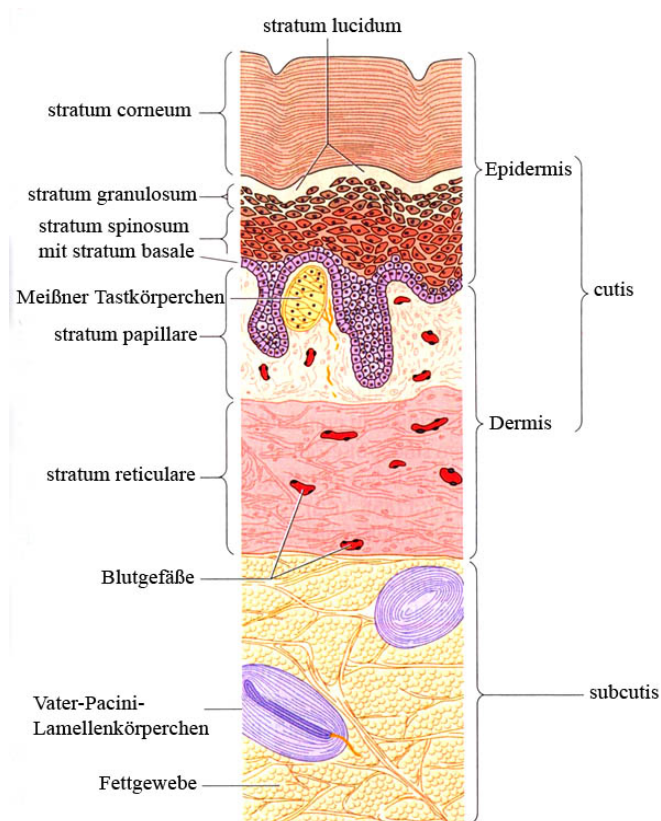
Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, welchen Beitrag die Proteine MIA und P-Cadherin möglicherweise bei der Auswanderung von Tumorzellen aus dem Zellverband leisten können.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Struktur und Aufbau der Haut*

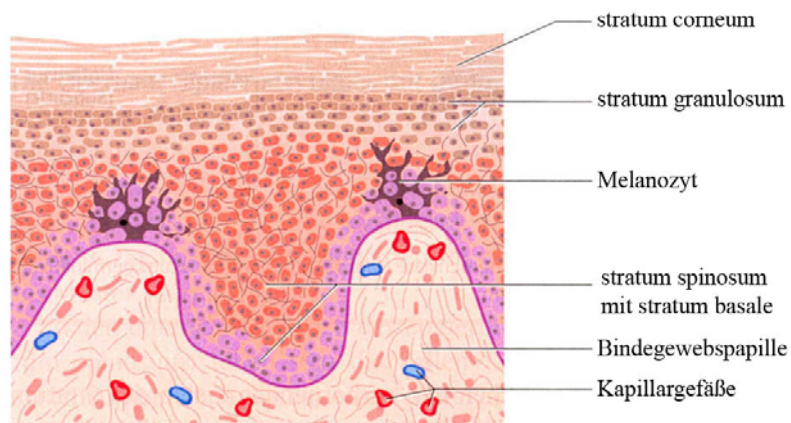
Die Haut ist das größte Organ des Körpers. Sie ist eine unterschiedlich dicke, sehr sensible, gut vaskularisierte Schicht, die den Körper bedeckt. Die Basalmembran trennt die epitheliale Epidermis von der bindegewebigen Dermis. Die Dermis grenzt an das subkutane Fettgewebe, welches zwischen der Haut und tiefer liegenden Strukturen liegt. Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut und enthält keine Nerven oder Blutgefäße. Sie schützt die Haut vor Umwelteinflüssen und regelt den Flüssigkeitshaushalt des Körpers. Sie besteht aus mehreren Zellschichten. Neben anderen spezialisierten Zellen enthält die Epidermis die Keratinozyten, die im *Stratum basale* als hochprismatische Basalzellen vorliegen. Ihre Tochterzellen wandern im Laufe der Zeit in Richtung Oberfläche und bilden dort zunächst das *Stratum spinosum*, welches eine weitere Lage aus polygonalen Zellen mit kurzen, stachelförmigen Fortsätzen bildet. Die älteren Zellen der nächsten Lage, dem *Stratum granulosum*, enthalten im Zytoplasma die namensgebenden Keratingranula. Keratin verleiht allen Teilen der Haut Festigkeit und Widerstandskraft. In der obersten Lage, dem *Stratum corneum*, befindet sich schließlich eine breite Lage von abgestorbenen Zellen, in denen das Keratin das gesamte Zytoplasma und den Nukleus ersetzt.

Weitere Zellen der Epidermis, welche nicht von den Basalzellen abstammen, sind die Melanozyten im *Stratum basale*. Diese Zellen bilden das Pigment Melanin und geben es an die Zellen der Epidermis und die Haarfollikel ab. Direkt unter der Epidermis liegt die Dermis. Diese Hautschicht besteht hauptsächlich aus dicken Bündeln von Kollagen, in dem Nerven, Blut- und Lymphgefäße, sowie Schweißdrüsen und Haarfollikeln, eingelagert sind. Bis in die Papillen im *Stratum spinosum*, versorgt sie auch die Epidermis mit Gefäßen (siehe Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2 ).



**Abbildung 2-1**

Gesamtübersicht über die verschiedenen Schichten der Haut (modifiziert nach Faller und Schünke, 2004).



**Abbildung 2-2**

### **Vergrößerte Ansicht der Epidermis.**

Die Abbildung zeigt, unter anderem, Melanozyten in der Basalzellschicht der Epidermis. Durch dendritische Ausläufer treten sie in Kontakt mit Keratinozyten (modifiziert nach Faller und Schünke, 2004).

### **2.1.1 Funktion der Melanozyten**

Melanozyten entstammen in der Entwicklung aus den Zellen der Neuralleiste des Embryos. Die ersten Zellen, die der Melanozytenlinie zugeordnet werden können,

sind die Melanoblasten; aus ihnen entstehen dann im Laufe der weiteren Entwicklung die ausdifferenzierten Melanozyten. Jeder Melanozyt besitzt Dendriten, die sich bis in die oberen Lagen der Epidermis erstrecken und Kontakte zu Keratinozyten knüpfen. Melanozyten produzieren Melanin, das dunkle Pigment von Haut, Haaren und Nägeln und transportieren es in Melanosomen in die nahegelegenen Haarzellen oder in die Keratinozyten. Zusammen mit 20 bis 35 Keratinozyten wird auf diese Weise eine epidermale Melanineinheit gebildet. Dieses Pigment schützt die DNA vor schädlichem UV-Licht (Hsu et al., 2002). Die Keratinozyten treten mit den Melanozyten in einem Verhältnis von 5:1 in Kontakt und kontrollieren das Wachstum und die Proliferation der Melanozyten (Hsu et al., 2002).

### **2.2 Das Maligne Melanom**

Das maligne Melanom (MM) ist ein bösartiger, stark pigmentierter Tumor. Er wird definiert als eine geschwulstartige Entartung der pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, und manifestiert sich überwiegend in der Haut. Seltener tritt das MM an der Uvea und Retina, an Hirnhäuten, sowie den Schleimhäuten verschiedenster Stellen des Körpers auf. Das Maligne Melanom wird in vier klar abgegrenzte Subtypen eingeteilt (Panizzon et al., 1999):

**Das superfiziell spreitende Melanom** stellt mit einem Auftreten von mehr als 50 Prozent die häufigste Form des Melanoms dar und erscheint als asymmetrische Hautveränderung mit unregelmäßiger Pigmentierung und Begrenzung.

**Das noduläres Melanom** (30%) ist ein erhabenes Melanom, das ebenfalls mit Pigmentveränderungen und unregelmäßigen Ausläufern einhergeht.

**Das lentigo-maligna Melanom** (10%) tritt typischerweise bei älteren Personen an belichteten Hautarealen auf, z. B. auf der Wange.

**Das akral-lentiginöse Melanom** (5%) tritt an Händen und Füßen auf.

Daneben existieren noch weitere seltene Formen, wie das amelanotische, das desmoplastische und das polypoide Melanom.

#### **2.2.1 Das Melanom – Geschichtlicher Hintergrund**

Im Laufe der Jahrtausende veränderte sich das Verhältnis der Menschen zur Sonne stetig. Während in Griechenland vor 2000 Jahren das exzessive Sonnenbaden zur Heilung und Regeneration bei Krankheiten genutzt wurde, war im 17. und 18. Jahrhundert die blasse Porzellanhaut ein Merkmal der Anmut und

Schönheit; zudem ein Unterscheidungsmerkmal der reichen Klasse, von der Arbeiterklasse (Ariel et al., 1981). Im 20. Jahrhundert dagegen wurde die dunkel gebräunte Hautfarbe ein Zeichen für Leute, die mit Geld für ein exklusives und angenehmes Leben in warmen Klimazonen besaßen. Im Laufe der Jahrhunderte wurde der Zusammenhang zwischen erhöhter Sonnenexposition und dem Auftreten des malignen Melanoms sichtbar. Besonders in den letzten Jahrzehnten, in denen die schützende Ozonschicht immer dünner wurde und die Menschen sich immer mehr ohne Schutz dem Sonnenbaden hingaben, stieg die Zahl der Neuerkrankungen am malignen Melanom in Europa drastisch an (siehe unten).

Die erste Beschreibung des Melanoms als eigene Krankheit gab der Pariser Rene Laennec um 1806, der auch das Wort „melanosis“ (griechisch für „Schwarz“) einführte. 1834 beschrieb David Williams als erster die horizontalen und vertikalen Wachstumsphasen eines sich oberflächlich ausbreitenden Melanoms (Silvers, 1982) und 1837 wurde das Melanom zum ersten Mal in Amerika von Isaiah Parrish beschrieben. Zu Ende des 19. Jahrhunderts gaben Josef Coats (1885) und Herbert Snow (1892) schon erste Anleitungen zur chirurgischen Beseitigung von Läsionen. Erste Beweise, dass es UV-Strahlung ist, die Hauterytheme verursacht, wurden von Widmark 1889 erbracht (E. J. Widmark „Über den Einfluss des Lichtes auf die Haut“). Der Zusammenhang zwischen Melanomen und der Sonneneinstrahlung wurde erst im Jahre 1894 von Unna (Randle et al., 1997) hergestellt; er beschrieb degenerative Hauterkrankungen bei Seeleuten („seamen’s skin“), die er dem Einfluss der Sonne zuschrieb. 1907 folgte dann Dubreuilh, der Hautkrebserkrankungen an sonnenexponierten Stellen bei Traubenpflückern in Bordeaux darstellte (Dubreuilh, 1907). Die erste zusammenfassende Studie über Melanompatienten in England wurde von William Norris 1920 gemacht (Norris, 1920). 1957 zeigten dann Lancaster und Nelson in Australien, dass Personen, die nicht braun wurden, sondern stattdessen leicht Sonnenbrand bekamen und Sommersprossen besaßen, eher von Hautkrebs betroffen waren, als Menschen mit braunem Teint. Sie machten die ersten wissenschaftlichen Versuche, das Sonnenlicht mit dem Auftreten von Melanomen zu korrelieren.

### 2.2.2 Mortalität und Inzidenz des malignen Melanoms

Bei Vergleich der Zahlen von 1990 bis 2000 steigt bei Männern und Frauen die Krebsinzidenz zwar an, die Mortalität jedoch blieb bei beiden Geschlechtern gleich. Im Jahr 1990 starben von 100000 Einwohnern 2,48 Männer und 1,6 Frauen, was sich bis ins Jahr 2000, mit 2,57 Männern und 1,7 Frauen, nicht sehr veränderte. Dies liegt an den stetig verbesserten Vorsorgeuntersuchungen und den modernen molekularen und bildgebenden Möglichkeiten, Melanome schon sehr früh zu diagnostizieren.

Die Zahl der Neuerkrankungen am malignen Melanom jedoch war 1990 bei Männern und Frauen, im Gegensatz zum Jahr 2000, relativ niedrig mit nur 2972 Männern und 4421 Frauen. Im Jahr 2000 stieg diese Zahl bei Männern auf 5348 und bei Frauen auf 6128. Die altersstandardisierte Krebsinzidenz fällt bei Männern und Frauen im Jahr 2000 auf ungefähr 12 je 100000 Einwohner, im Gegensatz zu 7,7, bei Männern, und 9,2, bei Frauen, im Jahr 1990 (Daten vom Robert Koch Institut).

[http://www.rki.de/cln\\_006/nn\\_243922/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbank\\_abfragen/datenbankabfragen\\_node.html\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_006/nn_243922/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbank_abfragen/datenbankabfragen_node.html_nnn=true))

### 2.2.3 Proteine, die an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sind

Eine natürliche Auswirkung der Sonnenstrahlung auf die Melanozyten ist die Anregung zur Produktion von Melanocortin (alpha-MSH), des Liganden des Melanocortin-1 Rezeptors (MC1R). Er schützt die Haut, indem er zur Produktion des Sonnenschutzpigments Eumelanin anregt. Verschiedene Varianten von MC1R bewirken hingegen die Produktion von Pheomelanin, welches weniger effektiv vor Sonneneinstrahlung schützt. Durch Sonneneinstrahlung werden aber auch Wachstumsfaktoren, wie der Stammzellfaktor (SCF), Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGF alpha) gebildet. Deren Signale werden mittels des Ras/Raf Signalweges übertragen, was zur Transkription und Translation zahlreicher Gene führt, die die Zellproliferation und Migration der Zellen anregen.

Eine übermäßige Einwirkung von ultravioletter Strahlung auf die Haut kann jedoch bösartige Veränderungen in der Haut hervorrufen, indem sie direkt mutagen auf die DNA wirkt. Sie setzt die Immunabwehr herab und erzeugt oxidierte Formen

von Melanin, die der DNA zusätzlichen Schaden zufügen und die Apoptose unterdrücken (Meyskens et al., 2004). Den so geschädigten Melanozyten ist es möglich, einen derartigen malignen Phänotyp anzunehmen, dass sie Blutgefäße zum Wachsen anregen können, dem Immunsystem entrinnen und schließlich metastasieren können (Satyamoorthy et al., 2002).

Im Folgenden werden einige der bekanntesten Proteine beschrieben, die für die Entstehung eines malignen Phänotyps der Melanozyten verantwortlich sind. Zu ihnen gehören Proteine, welche die Apoptose beeinflussen, Proteine der mitogenen Signalwege, Zellzyklusproteine und diverse Transkriptionsfaktoren.

### **Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind**

Dadurch, dass es den Melanomzellen durch die Überexpression von Apoptoseinhibitoren, wie BCL-2 und BclxL möglich ist, der Apoptose zu entkommen, ist eine Chemo- Radio- oder Immuntherapie zur Bekämpfung der Krankheit immer nur wenig erfolgreich (Soengas et al., 2003).

### **Proteine, die an mitogenen Signalwegen beteiligt sind**

In 21% von Melanomzelllinien ist N-RAS konstitutiv aktiv (Tsao et al., 1998). Ebenso sind in 70-90% von Primärmelanomen konstitutiv aktivierende BRAF-Mutationen enthalten (Davies et al., 2002; Dong et al., 2003; Shinozaki et al., 2004). Die Tatsache, dass man diese Mutationen auch in 60-80% gutartiger melanozytärer Nävi findet zeigt, dass hier eine hochkomplexe Maschinerie mit vielen „Sicherheitsstops“ im Zellzyklus agiert, welche die Zellen trotz Mutation davor schützen, sich ungehindert zu vermehren.

### **Proteine, die am Zellzyklus beteiligt sind**

Einen Zellzyklusstop bewirken die zwei Tumorsuppressoren p16 und p14ARF. Sie sind Produkte des Gens CDKN2A. Dieses Gen wird häufig in mutierter Form familiär vererbt und verleiht seinem Träger ein 8 fach höheres Risiko an Hautkrebs zu erkranken, als einem Träger des unmutierten Gens (Kefford et al., 2002). Intaktes p16 inhibiert Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs), deren Funktion darin besteht die Proliferation von Zellen zu fördern. Durch einen Verlust von p16 läuft der Zellzyklus unkontrolliert weiter. P14ARF verstärkt die Wirkung des Tumorsuppressors p53. Dieses Protein ist hauptsächlich dafür verantwortlich,

dass die DNA vor Schaden geschützt bleibt. P53 ist im malignen Melanom jedoch selten direkt mutiert. Durch eine Fehlregulation von p14ARF wird p53 aber vermehrt abgebaut. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Rate der Zellteilung und damit zu einem erhöhtem Tumorrisiko (Sharpless et al., 2003).

### **Proteine, die am Signalweg von MITF beteiligt sind**

Der Transkriptionsfaktor MITF ist maßgeblich an der Entwicklung des Pigmentsystems und der Melanogenese in Melanozyten beteiligt. Weil MITF an der Regulation vielfältiger tumorassoziierter Proteine beteiligt ist, scheint es auch bei der Entstehung des malignen Melanoms eine wesentliche Rolle zu spielen. Die maligne Veränderung der Proteine im Signalweg von MITF, hat folglich eine große Auswirkung auf die Entartung von Melanozyten. MITF ist für deren Entwicklung sehr wichtig, weil Melanoblasten, die kein MITF exprimieren, nach 2 Tagen sterben (Nakayama et al., 1995). Aktiviert wird MITF durch Pax3 (Galibert et al., 1999; Kamaraju et al., 2002) und Sox10 (Elworthy et al., 2003). Auch die LEF/TCF Familie von Transkriptionsfaktoren beeinflusst den MITF-Promotor (Dorsky et al., 2003; Saito et al., 2003). MITF bindet seinerseits an Promotoren der Gene Tyrp1, Dct und Silver. Diese Gene sind für die Bildung von Melanosomen wichtig (Du et al., 2003). Auch in die Apoptoseregulation greift MITF ein, indem es die Expression des apoptosehemmenden Proteins BCL2 erhöht. Das heißt, dass die Zellen eine vermehrte Überlebenschance haben, wenn vermehrt MITF in der Zelle vorliegt und dadurch das Tumorrisiko steigt.

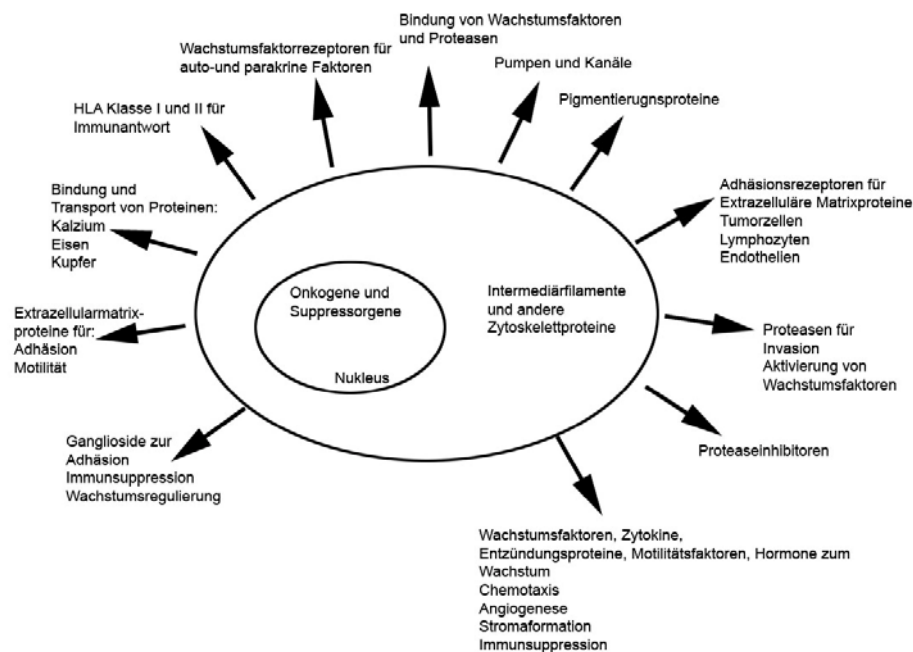
### **Allgemeine Einflüsse auf die Entwicklung des malignen Melanoms**

Während dem Übergang von einem normalen Melanozyten zu einer malignen Läsion und während der Transformation zu einem metastasierenden Tumor, vollziehen sich vielfältige Veränderungen in der Kommunikation zwischen den Zellen. Diese Veränderungen statten die Melanozyten mit der Fähigkeit aus, sich aus gewöhnlichen Zellverbänden zu lösen und sich schließlich der Kontrolle der Keratinozyten zu entziehen. Auf diese Weise ist es ihnen möglich, in umliegendes und entferntes Gewebe einzuwandern. Bei der Umwandlung in eine Tumorzelle beobachtet man bei den Melanozyten verschiedene Phasen, die einhergehen mit dem Verlust von E-Cadherin und der Expression von N-Cadherin. Dadurch werden die Zellen befähigt statt an Keratinozyten, an Fibroblasten und vaskuläre



Endothelzellen zu binden. Dazu kommt eine vermehrte Expression von Zell-Zelladhäsionsmolekülen, wie Mel-CAM, L1-CAM, oder den Integrinen  $\alpha v \beta 3$  und  $\alpha 4 \beta 1$ .

Neben all diesen Einflüssen, welche Apoptose unterdrücken und Zellproliferation und Migration fördern, spielen bei der Entstehung des malignen Melanoms noch zahlreiche andere Proteine innerhalb und außerhalb der Zellen eine große Rolle. Dieses Faktum soll mit Abbildung 2-3 dargestellt werden. Alle Moleküle hier einzeln aufzulisten und zu beschreiben würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Diese Dissertation stützt sich besonders auf die Untersuchung der Adhäsionsmoleküle, deren abnorme Expression und Beeinflussung von veränderten externen Faktoren letztlich für die Auswanderung der Krebszellen in anderes Gewebe, verantwortlich ist.



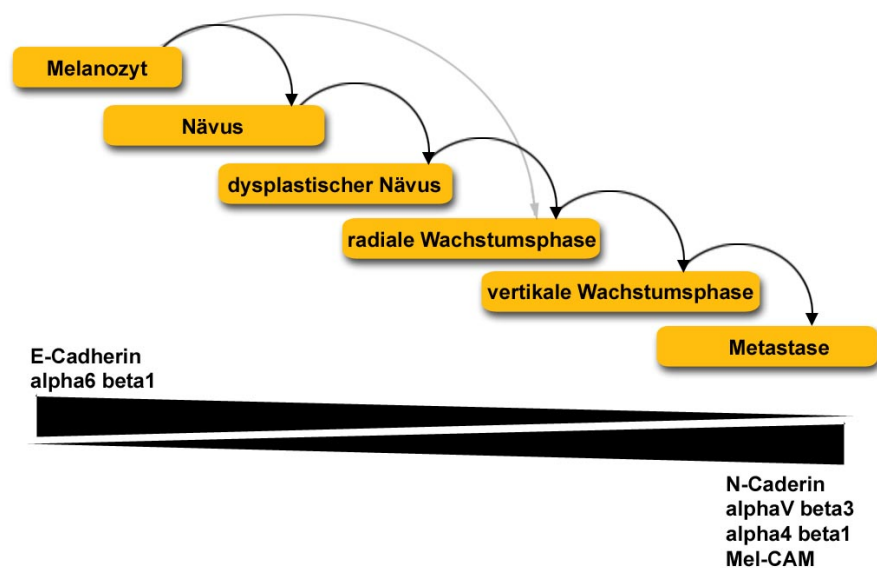
**Abbildung 2-3**

Übersicht über melanomassoziierte Antigene. (Modifiziert nach „Molecular and Cellular Biology of Melanoma“, Meenhard Herlyn, 1993, R.G. Landes Company).

### Phasen der Entstehung des malignen Melanoms

Abbildung 2-4 illustriert die fünf Schritte vom normalen Melanozyten, zum metastasierenden Melanom, die durch klinische und histopathologische Merkmale voneinander unterschieden werden (modifiziert nach Hsu et al., 2002). Hier muss

man anmerken, dass der Übergang von einem Schritt zum nächsten mit dramatischen Veränderungen innerhalb der Zellen einhergeht. So entwickelt sich nicht aus jedem Nävus ein dysplastischer Nävus. Andererseits ist es auch umstritten, ob Nävi generell einen Ausgangspunkt der Melanomentwicklung darstellen. Bisher besteht auch die Hypothese, dass Melanozyten direkt in die radiale Wachstumsphase übergehen können. Nävi enthalten normale Melanozyten, die weder strukturelle, noch zytogenetische Abweichungen aufweisen. Die dysplastischen Nävi zeigen schon strukturelle Abweichungen. In der radialen Wachstumsphase der primären Melanome breiten sich die Zellen ringförmig in der Epidermis aus, sind jedoch noch nicht metastasierend. Erst im späten Stadium der vertikalen Wachstumsphase können die primären Melanomzellen in die Dermis einwandern und haben das Potential zu metastasieren. In der letzten Phase, dem metastasierendem Melanom, wandern die Zellen vom Ursprungsort aus und besiedeln entfernt liegende Organe (Li et al., 2002).



**Abbildung 2-4**

**Phasen der Melanomentwicklung.**

In der Abbildung finden sich nur einige wenige fehlregulierte Moleküle, die bei der Entstehung des Melanoms eine wichtige Rolle spielen.

### **2.3 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle im malignen Melanom**

#### **2.3.1 Cadherine**

Cadherine sind eine Gruppe funktionell miteinander verwandter transmembraner Glykoproteine, die Kalziumabhängige Zell-Zelladhäsion in allen soliden Geweben des Körpers vermitteln; dort sind sie für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebe zuständig (Gumbiner et al., 1996).

Zu ihrer Gruppe gehören

- 1) Klassische Cadherine, welche die Hauptkomponenten der Zell-Zellverbindungen darstellen (Typen I und II).
- 2) die desmosomalen Cadherine (Desmocolline und Desmogleine).
- 3) Protocadherine.
- 4) Cadherin-verwandte Proteine (zum Beispiel das *fat* protein in *Drosophila*) (Siehe Suzuki 1996a).

Die Typen I der klassischen Cadherine stellen die E-, P- und N-Cadherin dar. Zum Typ II gehören alle Cadherine 5 bis 12. Die Cadherine werden differentiell über im Gewebe exprimiert. E-Cadherin kommt im Normalgewebe im Epithel vor, P-Cadherin in der Plazenta und embryonalem Gewebe und N-Cadherin wird hauptsächlich in Endothelien, Neuronal- und Muskelzellen exprimiert.

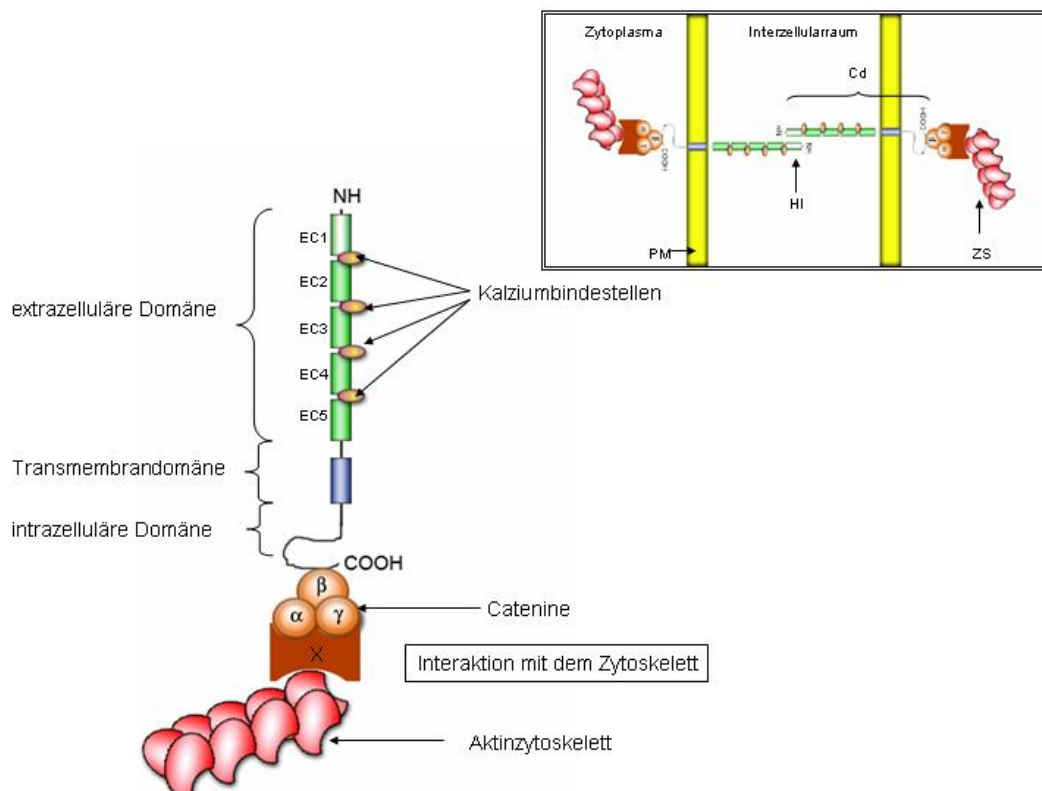
Cadherine bilden hochspezifische homophile Zell-Zelladhäsionen aus, d.h. sie helfen Zellen sich miteinander zu verbinden, indem die extrazellulären Komponenten von jeweils zwei gleichen Cadherinen miteinander in Wechselwirkung treten. Zusätzliche Stabilität wird dadurch erreicht, dass die intrazellulären Domänen der Cadherine mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind (siehe Abbildung 2-5). Derartige Zell-Zell Verbindungen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Embryogenese (Takeichi et al., 1991) und der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und Homöostase im erwachsenen Organismus.

Die N- und C-Termini der Cadherinproteine befinden sich jeweils außerhalb beziehungsweise innerhalb der Zelle. Der extrazelluläre Teil besteht aus einer variierenden Anzahl sehr homologer Cadherindomänen, wobei jede Domäne aus ungefähr zehn Aminosäuren besteht.

Die klassischen Cadherine enthalten fünf Domänen EC1-EC5, beginnend am N-Terminus (siehe Abbildung 2-5). Für die direkte Bindung zwischen den Molekülen ist nur EC1 wichtig, wobei die verbleibenden vier Domänen als Platzhalter dienen,

welche die Distanz zwischen den Zellen bewahren. Die N-terminale Domäne allein bewirkt keine funktionelle Bindung (Yap A et al., 1997). Zwischen diesen Domänen befinden sich hochkonservierte Kalziumbindestellen. Cadherine sind nur in Gegenwart von Kalzium stabil, welches an die für sie vorgesehenen Stellen binden muss, damit Zell-Zelladhäsion stattfindet.

Der zytoplasmatische Teil der klassischen Cadherine ist mit alpha-, Beta- und Gamma-Cateninen (Plakoglobinen) verbunden; das sind zytoplasmatische Proteine, die als Mediatoren zwischen den Cadherinen und den Aktinfilamenten dienen und so zur Zell-Zelladhäsion beitragen. Beta-Catenin bindet dabei direkt an die zytoplasmatische Domäne und dient als *linker* (Verbindungsbrücke) für eine alpha-Cateninbindung, welches an den N-Terminus von Beta-Catenin bindet (Funayama et al., 1995; Hulsken et al., 1994; Oyama et al., 1994). alpha-Catenin bindet *in vitro* und *in vivo* Kulturzelllinien direkt an das alphaactinin der Aktinfilamente (Rimm et al., 1995).



**Abbildung 2-5**

### **Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus von Cadherinen.**

Das Protein ist mittels der Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Die extrazelluläre Domäne (ED) verbindet durch homophile und kalziumabhängige Interaktion jeweils gleiche Zellen miteinander. Die ED besteht aus 5 homologen, sich wiederholenden Einheiten (EC1 bis EC5), wobei die homophile Interaktion mit EC1 zustande kommt. Die intrazelluläre Domäne ist mit dem Proteinkomplex der Catenine verbunden, die wiederum Kontakte zum Zytoskelett der Zelle herstellen und zusätzlich Signale an unterschiedliche Proteine der Zelle weitergeben. PM= Plasmamembran, HI= homophile Interaktion, ZS= Zytoskelett, Cd= Cadherin.

Gamma-Catenin (Plakoglobin) kann manchmal an Stelle von Beta-Catenin wirken. In Mausembryonen wurde jedoch festgestellt, dass es Beta-Catenin nicht vollständig ersetzen kann (Haegel et al., 1995). Plakoglobin ist der Hauptbestandteil von Desmosomen; dort ist es mit desmosomalen Cadherinen verbunden (Cowin et al., 1986). Deletiert man Plakoglobin, entstehen letale Herzfehler, wahrscheinlich durch Fehler in der Desmosomenstruktur, und es tritt ein früher Tod des Mausembryos ein. Es wurde bewiesen, dass eine stabile Ausbildung einer Adhäsion zwischen zwei Zellen nur zustande kommt, wenn die Cadherine zwei funktionell aktive Domänen besitzen: Die äußere Bindedomäne und die mit dem Zytoskelett verbundene zytoplasmatische Domäne (Ozawa et al., 1990; Nagafuchi et al., 1988; Briher et al., 1996).

Die bekannteste Zell-Zell Verbindung ist die *zonula adhaerens* an der apikolateralen Grenze der Epithelien. Hier knüpfen Aktinfilamente an die adhäsiven Verbindungen an und lagern sich innerhalb der Zelle an der Zellmembran an. Sie bilden, gemeinsam mit dem adhäsiven Proteingerüst, ein sich kontrahierendes Netzwerk im Epithel, das, unter anderem, für die Morphologie der Epithelien verantwortlich ist (Mooseker et al., 1984; Madara et al., 1988).

Cadherine integrieren auch verschiedenste Signale und leiten diese in das Zellinnere. Diese Signale stammen von Wachstumsfaktoren (Bradley et al., 1993), Peptidhormonen (Brabant et al., 1995 ; Bracke et al., 1995), *gap junctions* (Paul et al., 1995) und Agonisten von Cholinrezeptoren (Williams et al., 1993). Durch sie werden den Zellen vielfältigste Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt ermöglicht.

### **2.3.2 Die Rolle der klassischen Cadherine im malignen Melanom**

Das Expressionsmuster der Cadherine ist beim Aufbau der Haut ein sehr wichtiges Kriterium. Das lokale Muster der Cadherine bestimmt die Verteilung der verschiedenen epidermalen Zelltypen im Raum und es gibt Hinweise darauf, dass E- und P-Cadherin eine wichtige Rolle bei der gerichteten Wanderung der melanozytären Vorläuferzellen im Embryo, spielen (Nishimura et al., 1999). E-Cadherin wird in der normalen Haut auf der Oberfläche von Keratinozyten, Melanocyten und Langerhanszellen gebildet und befindet sich an den interzellulären Grenzen zwischen Melanozyten und Keratinozyten (Tang et al., 1994; Silye et al., 1998). Eine Fehlfunktion der E-Cadherin-abhängigen Zell-Zellinteraktionen im Epithel schwächt zunächst die Zell-Zellverbindungen und verstärkt dadurch die Zellbeweglichkeit. Neben einem Verlust des epithelialen

Phänotyps verlieren die Zellen auch die Fähigkeit, ihre Proliferation bei Zellkontakt einzustellen (Kontaktinhibition). Das Ergebnis ist eine unkontrollierte Proliferation und Invasion von Zellen (Takeichi et al., 1993).

Ein Hauptaugenmerk der Studien des letzten Jahrzehnts lag auf dem Einfluss von E-Cadherin bei der Entstehung einiger bösartiger Karzinome, wie Ösophagus-, Magen-, oder Brustkarzinome, sowie dem malignen Melanom. E-Cadherin wurde in Tumoren als Tumorsuppressor beschrieben. Das Protein war in malignem Gewebe entweder nicht vorhanden oder zeigte stets eine anomale Verteilung und niedrige Expression. Ein Verlust von E-Cadherin ging mit undifferenzierten epithelialen Karzinomen mit hohem Invasionspotential und Metastasierung einher (Shiozaki et al., 1991; Berx et al., 1995, 1996; Perl et al., 1998; Christofori et al., 1999; Melki et al., 2000; Poser et al., 2001; Hajra and Fieron 2002).

Neben Signalwegen, die spezifisch von Zell-Zellkontakten beeinflusst werden, konnten einige Studien in der letzten Zeit zeigen, dass E-Cadherin auch an diversen Signalwegen außerhalb der Adhäsion beteiligt ist. Einen bekannten Weg stellt dabei die beta-catenin/LEF/T-cell factor (TCF) Signalkaskade dar (Nollet et al., 1999; Novak and Dedhar 1999), oder der Faktor NFkappaB, dessen Expression bei Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom, hochreguliert wird (Kuphal et al., 2004).

Ein Signal, welches regulatorisch auf E-Cadherin einwirkt, kommt von der Snail-Proteinfamilie, die E-Cadherinexpression reprimiert. Außerdem wurde gezeigt, dass Snail nur in Melanomen exprimiert wird, nicht jedoch in normalen Melanozyten. Ebenfalls konnte dargestellt werden, dass eine Erhöhung oder Erniedrigung der Snail-Expression in direktem Zusammenhang mit der Expression von E-Cadherin steht (Poser et al., 2001).

Für N-Cadherin wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression, bei gleichzeitigem Rückgang der E- und P-Cadherin Konzentration mit der Änderung des Phänotyps von epithelial zu mesenchymal einhergeht (Islam et al., 1996). Während der Entwicklung und Progression eines Melanoms, geht E-Cadherin verloren und dabei wird gleichzeitig die N-Cadherin-Expression erhöht. Dieses „Umschalten“ eines Cadherins auf ein anderes führt dazu, dass Melanozyten ihre Bindungspartner ändern und, statt an Keratinozyten, an Fibroblasten und VE-Zellen adhären (Hsu et al., 1996). Zusätzlich scheinen erhöhte N-Cadherin Proteinmengen die Apoptose von Zellen negativ zu beeinflussen (Li et al., 2001a).

Klinische Studien haben auch gezeigt, dass im VGP- Stadium des Melanoms E- und P-Cadherin- Expression niedrig und die N-Cadherin erhöht ist (Sanders et al., 1999). Ebenfalls wurde gezeigt, dass UVB Strahlung zur verminderten Expression von E- und P-Cadherinen in humanen epidermalen Melanozyten führen kann (Seline et al., 1996). Für P-Cadherin wurde gezeigt, dass bei verminderter Expression ein erhöhtes Invasionsrisiko von Lungenkarzinomen besteht (Smythe et al., 1999).

### **2.4 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle im malignen Melanom**

#### **2.4.1 Integrine**

Integrine sind die wichtigsten Proteine, mit deren Hilfe Zellen an die extrazelluläre Matrix binden können (siehe Abbildung 2-6). Sie sind an der Regulation vielfältigster physiologischer Prozesse, der embryonalen Entwicklung, der Angiogenese und der Tumorgenese beteiligt. Mit insgesamt 18 alpha-Untereinheiten und 8 Beta-Untereinheiten, bilden die Transmembranglykoproteine mindestens 25 verschiedene Integrinheterodimere. Sie verbinden das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix und geben der Zelle auf diese Weise diverse Informationen über deren Lokalisation im Körper und ihr näheres zelluläres Umfeld (Pfarrer et al., 2003).

Abhängig von der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und Ligandenspezifität, lassen sich die Integrine in vier Unterfamilien einteilen:

Die beta1-Unterfamilie. Sie stellt die größte Unterfamilie dar, in der die beta1 Untereinheit mit 12 alpha Untereinheiten assoziiert sein kann. beta1 Integrine sind weit verbreitet und verbinden Zellen hauptsächlich mit der extrazellulären Matrix

Die Leukozytenspezifischen Beta2- und Beta7-Unterfamilien, welche die Interaktion mit interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs), E-Cadherin und Fibrinogen steuern

Die alphav-Unterfamilie, welche in der Säugerorganogenese eine wichtige Rolle spielt. Sie wird in Endothelien, Epithelien, Osteoklasten und verschiedensten Tumoren exprimiert (van der Flier and Sonnenberg 2001).

Die Beta3-Unterfamilie, ein Marker für erhöhte Cancerogenität in entarteten Melanozyten. Weiterhin ist das Heterodimer alphav Beta3 an der Entstehung des malignen Melanoms und anderen Tumoren, beteiligt. Auch das auf Blutplättchen

exprimierte  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 Integrin ist an der Invasion von Melanomzellen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Koagulation (Trikha et al., 1997).

Neben der Rolle bei der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, sind Integrine auch an der Weiterleitung von Signalen in die Zelle („*outside-in signaling*“) und aus der Zelle heraus („*inside-out signaling*“) beteiligt (Aplin et al., 1998). Durch Signale innerhalb der Zelle wandeln sich Integrine von einer passiven, schwachen Bindungskonformation in eine aktive adhäsive Konformation und ändern so ihre Interaktion mit ihrem extrazellulären Umfeld. Bei dem Verlust der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix werden Kaspasen aktiviert, welche die Apoptose einleiten. Dieser Vorgang wird auch „Anoikis“ bezeichnet (Stupak et al., 2001; Pankov et al., 2003).

### 2.4.2 Die Struktur der Integrine

Sowohl die  $\alpha$ , als auch die  $\beta$ -Untereinheit der Integrine besitzen eine große extrazelluläre Domäne, einen kurzen transmembranen Bereich und eine zytoplasmatische Domäne von durchschnittlich 20 bis 50 Aminosäuren (siehe Abbildung 2-6). Eine Ausnahme dabei ist Integrin  $\beta$ 4, deren zytoplasmatischer Teil mehr als 1000 Aminosäuren umfasst. Einige  $\alpha$ -Untereinheiten werden in der Nähe ihrer Transmembrandomäne proteolytisch geschnitten ( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8 und  $\alpha$ v), wobei die zwei Ketten dann durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

Die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus vier, jeweils circa 40 Aminosäuren langen, sich wiederholenden, zysteinreichen, Segmenten, nahe der Transmembrandomäne.

Die Ligandenbindung durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, erfolgt am N-Terminus durch Dimerisierung (Mehta et al., 1998). Die zwei Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verknüpft und haben, im Vergleich zu anderen Rezeptoren, schwache Bindungsaffinitäten zu ihren Liganden. Diese schwache Affinität sorgt dafür, dass sich Zellen schnell an ihre Umgebung haften, aber auch wieder lösen können, was die molekulare Grundlage für Zellmotilität und Invasion darstellt (Brakebusch et al., 2003).

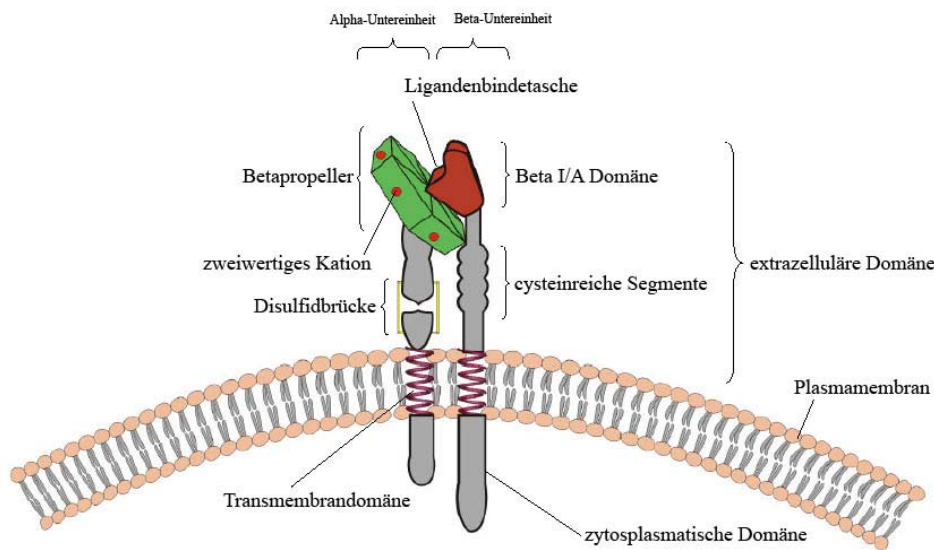


### 2.4.2.1 Die extrazelluläre Domäne

Die extrazellulären Domänen der Integrin alpha-Untereinheiten bestehen aus sich siebenfach wiederholenden, 60 Aminosäuren langen Modulen, welche bivalente Kationen, wie Kalzium oder Mangan, binden können. Diese Module nehmen die Konformation einer scheibenförmigen Struktur an, dem siebenschneidigen Beta-Propeller (siehe Abbildung 2-6). Acht der alpha-Untereinheiten (alpha1, alpha2, alpha10, alpha11, alphaD, alphaE, alphaM und alphaX) enthalten eine I/A Domäne, welche wichtig für die Protein-Protein Interaktionen ist, und die Ligandenbindungsstelle bilden (Hynes et al., 2002). Die andere Hälfte der alpha-Untereinheiten, welche keine I/A Domäne besitzt bekommt die Ligandenspezifität durch ihre Beta-Untereinheiten, die mit ihnen interagieren. Diese Beta-Untereinheiten enthalten eine hochkonservierte I/A Domäne, welche durch ihr MIDAS-Motif in der Lage ist, Metallionen, wie  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$ , zu binden. Durch Bindung der Metallionen, ändert sich die Konformation dieser I/A Domäne und macht so die Integrine bereit zur Bindung an ihre Liganden (= *priming*) (Humphries, 2004). Diese Domäne assoziiert mit einer Seite des Propellerkopfes der alpha-Untereinheit und bildet damit die Ligandenbindetasche der Integrine aus.

### 2.4.2.2 Die zytoplasmatische Domäne

Der zytoplasmatische Teil der alpha- und Beta-Untereinheiten stellt das Verbindungsglied zwischen extrazellulärer Matrix und dem Aktinzytoskelett der Zelle dar. Von dort aus leiten vielerlei rekrutierte Struktur- und Adapterproteine intrazelluläre Signale weiter.



**Abbildung 2-6**

### **Aufbau eines Integrindimers.**

Die Untereinheiten alpha und beta bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einem meist kurzem zytosplasmatischen Bereich. Die alpha-Untereinheit besitzt am N-Terminus einen aus beta-Faltblättern geformten Bereich („Betapropeller“). Dieser ist in der Lage zweiwertige Kationen zu binden. Die beta-Untereinheit enthält zysteinreiche Segmente nahe der Transmembrandomäne und N-terminal eine I/A-Domäne, welche Metallionen binden kann. Die zytosplasmatischen Domänen geben Signale in das Zellinnere weiter (Abbildung nach Kuphal, Bauer und Bosserhoff, 2005).

### **2.4.3 Die Rolle der Integrine im malignen Melanom**

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit weisen darauf hin, dass das Protein MIA spezifische Integrine und deren Signalwege im malignen Melanom auf vielfältige Weise moduliert. Dadurch verändert sich das Adhäsionsverhalten der Zellen, und diese können in fremde Gewebe auswandern. Im Folgenden sollen die Integrine und ihre Signalwege vorgestellt werden von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms spielen. Normalerweise ist das Integrin-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche sehr spezifisch in Raum und Zeit und hilft der Zelle sich perfekt auf ihre Umgebung einzustellen. Während der Embryogenese dienen Integrine auf den Zellen der Lokalisierung und Zielfindung ihres Bestimmungsortes. Viele Studien haben gezeigt, dass während der Entartung von Zellen das Expressionsmuster der Integrine verändert wird. Häufig geht erhöhte Integrinexpression mit einem metastasierendem Phänotyp der Zellen einher (Marshall et al., 1998).

### 2.4.4 Die Integrinexpression in Melanozyten

Normale Melanozyten haben ein Integrin-Expressionsmuster, das sich von Melanomzellen unterscheidet. In der Literatur findet man viele Studien, welche die unterschiedliche Expression der Integrinuntereinheiten verdeutlichen; man muss jedoch bei diesen Studien zwischen *in situ*-Analysen an Gewebeproben und Analysen von Zellen, die in Kultur gewachsen sind, unterscheiden. Es zeigen sich oft auch Unterschiede in der Betrachtung der Untereinheiten alleine, im Gegensatz zu Analysen mit Antikörpern, die gegen die Dimere gerichtet sind. Bei den Melanozyten scheinen *in situ* alpha3-, alpha6-, alphav-, und beta1-Untereinheiten vorhanden zu sein (Zambruno et al., 1993). Viele Untersuchungen zeigen aber auch, dass es starke Unterschiede zwischen Melanozyten *in situ* und in Kultur gibt. alpha5 beta1, alpha3 beta1 und alphav beta3, zum Beispiel, werden lediglich bei Melanozyten in Kultur gefunden, nicht jedoch in Melanozyten *in situ*. Ferner wurden bei Melanozyten in Kultur keine Expressionen von alpha1 beta1, oder alpha4 beta1 gefunden (Zambruno et al., 1993; Elshaw et al., 2001).

### 2.4.5 Die Integrinexpression im malignen Melanom

Eine herausragende Rolle für die Ausbildung von Metastasen des Brustkrebses und des malignen Melanoms spielt das Integrindimer alphav beta3. Eine Blockade dieses Integrins kann metastatisches Wachstum *in vivo* verhindern (Trikha et al., 2002). Im Melanomgewebe wurde außerdem gezeigt, dass die Expression der Integrine alpha3 beta1, alpha4 beta1, alpha5 beta1 erhöht ist (Friedl et al., 1998; Natali et al., 1993; Schadendorf et al., 1997; Johnson et al., 1999). Zusätzlich zeigten Studien von Hangan et al., dass alpha6 beta1 Integrine *in vivo* wichtig für die Metastasierung von Maus- Melanomzellen in die Leber sind (Hangan et al., 1997).

Studien, die sich auf Integrinmonomere konzentrierten, wiesen in primären und metastasierenden malignen Melanomen *in situ* erhöhte Expressionen der Untereinheiten alphav, alpha2, alpha3 und alpha4 nach (Moretti et al., 1993; Hartstein et al., 1997; Nikkola et al., 2004). In Gewebeschnitten von Patienten mit stark metastasierenden Zellen zeigte sich eine hohe Expression von alpha6, moderate Expression von alpha1 und keine alpha7 Expression (Ziober et al., 1999). Unter den fehlregulierten Integrin beta-Untereinheiten sind die Konzentrationen sowohl von beta1- als auch beta3 Integrinuntereinheiten in

Melanommetastasen erhöht (Hartstein et al., 1997; van Belle et al., 1999; Nikkola et al., 2004).

### **2.5 Die Adhäsion von Zellen**

Alle Zellen in den Geweben werden auf unterschiedliche Weise zusammengehalten. Eine sehr wichtige Rolle spielt dabei die extrazelluläre Matrix. Sie besteht hauptsächlich aus sezernierten Makromolekülen und stellt ein komplexes Gerüst dar, zu welchem die Zellen hauptsächlich über Integrine Kontakt aufnehmen. Die Matrix ermöglicht es den Zellen, sich in ihr zu bewegen und miteinander zu kommunizieren. Neben Kontakten zur Matrix, können Zellen auch untereinander adhären. Dies tun sie über vielfältige Zell-Zellverbindungen, die es ihnen ermöglichen zusammenhängende Gewebe auszubilden und Signale untereinander auszutauschen.

In Epithelien, wie der Epidermis der Haut, kaum extrazelluläre Matrix vorhanden und besteht hauptsächlich aus der Basallamina, die wie eine dünne Matte unter der Basalzellschicht liegt. Hier halten die Zellen durch ihre Kontakte untereinander den meisten mechanischen Stress aus.

Dafür durchziehen Netzwerke von Aktinfilamenten das Zytoplasma, die dann an spezialisierte Verbindungen an der Plasmamembran, anhaften. Die Verbindungen, wiederum, knüpfen die Zellen entweder aneinander oder an die Basallamina.

#### **2.5.1 Signalkaskaden, bei der Zell-Matrixadhäsion, ausgehend von Integrinen**

Integrine kontrollieren viele Signalwege in der Zelle. Sie beeinflussen, zum Beispiel Tyrosinkinasen, Serin/Threoninkinasen, Phosphoinositide und Signalkaskaden, die Zellen zum Wachstum, zur Proliferation oder zum programmierten Zelltod bringen. Um es den Zellen zu ermöglichen, spezifisch auf die überaus große Anzahl der Signale innerhalb und außerhalb zu reagieren, sind viele Helferproteine notwendig, um alle diese Vorgänge zu integrieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Frage, welche Signale bei der Ablösung der Integrine von ihrem Substrat, in die Zelle geleitet werden und welche Proteine dadurch beeinflusst werden. Im folgenden Abschnitt werden deshalb einige Proteine aufgeführt, von denen die Interaktion mit Integrinen bekannt ist und die an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sind.

### *Fokal adhesion kinase (FAK)*

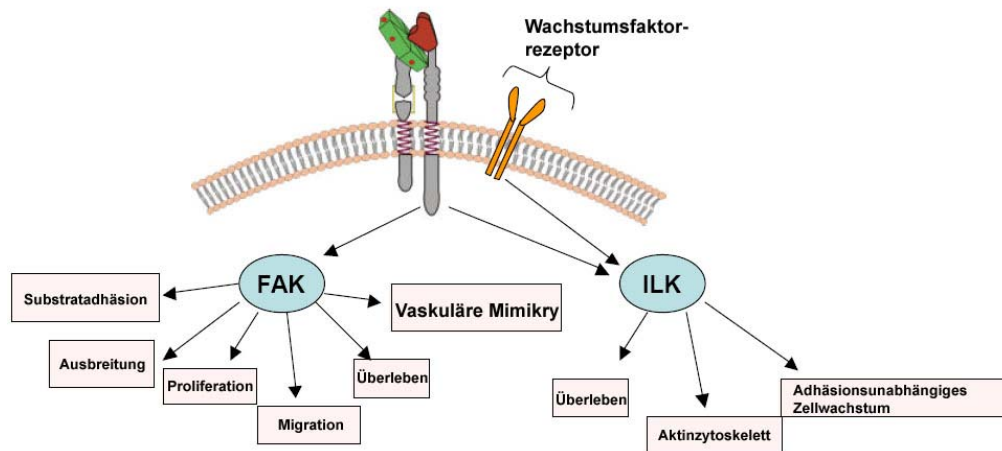
FAK hat ein Molekulargewicht von 125 kDa und hat eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade, die von den Integrinen ausgeht. Sie ist eine Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase und ko-lokalisiert mit Integrinen an fokalen Adhäsionen. Dort regeln assoziierte Proteinkomplexe die Ansammlung und Integration des Aktinzytoskeletts. FAK kann sich selber phosphorylieren, reguliert die Zelladhäsion, Motilität, Proliferation, das Ausbreiten der Zellen und ist am Zelladhäsionsabhängigen Überleben beteiligt (Frisch et al., 1996; Xu et al., 2001; Schlaepfer et al., 1994; Calalb et al., 1995; Schaller, 2001). FAK interagiert mit Proteinen, wie c-SRC, SHC, CSK PI-3-Kinase, Paxillin, dem SH3-Adapterprotein p130Cas und GRB2 und ist so mit dem MAP-Kinase Signalweg verbunden (Cobb et al., 1994; Guinebault et al., 1995; Sabe et al., 1994; Schlaepfer et al., 1997; Khwaja et al., 1997; Chen et al., 1995). Die Verbindung zu vielfältigsten Proteinen, die eine zentrale Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielen, macht FAK zu einem wichtigen Faktor in der Entstehung eines malignen Phänotyps. Deshalb ist dieses Protein auch ein Ziel für die Antitumorthherapie.

In Melanomzellen scheint FAK für die Substratadhäsion verantwortlich zu sein. Es wurde außerdem gezeigt, dass FAK im malignen Melanom konstitutiv aktiv ist. (Kahana et al., 2002). Es gibt auch eine Verbindung von FAK zur Kinase EphA2, die den Prozess der vaskulären Mimikry in hoch aggressiven Melanomzellen vermittelt (Hendrix et al., 2003). Abbildung 2-7 zeigt die Zusammenhänge und die unterschiedlichen Reaktionen der Zelle auf die FAK-Signalkaskaden.

### *Integrin-linked kinase (ILK)*

Bis jetzt gibt es relativ wenige Informationen darüber, welche Rolle die ILK bei der Entwicklung des Melanoms spielt. Überexpression oder der Entzug des Proteins haben weit reichende Konsequenzen auf die Zellen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass ILK an der Entartung und Transformation vieler Zellen beteiligt ist. ILK wurde 1995 als ubiquitär exprimierte zytosolische Serin/Threoninkinase entdeckt. Es bindet an die zytoplasmatischen Teile von beta1 und beta3 Integrinen und besteht selber aus drei Domänen (Hannigan et al., 1996; Pasquet et al., 2002). Man findet das Protein an fokalen Adhäsionen, an Verbindungen zwischen Integrinen und dem Aktinzytoskelett und es ist sehr wichtig für die Ausbildung von Zellkontakten mit der extrazellulären Matrix (Wu 2001; Wu and Dedhar 2001). ILK interagiert mit vielen Proteinen, welche Signalverbindung zwischen der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren und dem Aktinzytoskelett herstellen (Yamaji et al., 2001; Tu et al., 2001; Nikolopoulos et al., 2001; Persad and Dedhar 2003) (siehe Abbildung 2-7). Einige Proteine lassen sich *in vitro* direkt von ILK phosphorylieren (Troussard et al., 1999). ILK ist in der Lage Apoptose zu unterdrücken und das Überleben der Zellen zu fördern (Delcommenne et al., 1998; Persad et al., 2000). Die Überexpression von ILK in Epithelzellen resultiert in einem Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix Kontakten und fördert auf diese Weise Zelladhäsion unabhängiges Wachstum (Radeva et al., 1997). Im Melanom wurde außerdem gezeigt, dass eine vermehrte Expression von ILK mit der Progression des Tumors korreliert und einen inversen Zusammenhang mit der 5 Jahre Überlebensrate von Patienten zeigt (Dai et al., 2003).

Abbildung 2-7 zeigt die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen, für die der ILK Signalweg verantwortlich ist.



**Abbildung 2-7**

**Schematische Darstellung der Signalwege von den Integrinen über FAK (*fokal adhesionskinase*) und ILK (*integrin linked kinase*)**

Beide Kinasen werden von Integrinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Sie zeigen weit reichenden Einfluss auf das Überleben, die Fortbewegung und die Proliferation von Zellen.

### SRC homology and collagen (*SHC*)

Auch für SHC ist die Bedeutung im Melanom noch nicht ganz geklärt. Jedoch sprechen auch hier viele Indizien dafür, dass seine Dysregulierung auch sehr wichtig in der Entstehung von entarteten Melanozyten ist. Das Adapterprotein SHC spielt aber ebenfalls in der Signalkaskade von Integrinen eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass beta1 Integrine und alpha v beta3 an SHC, mittels des Adapterproteins Caveolin, assoziieren (Wary et al., 1998). Wenn SHC phosphoryliert wird, ist es in der Lage MAP-Kinasen zu aktivieren und das Zytoskelett der Zellen zu organisieren (Luzi et al., 2000). Viele Studien haben auch demonstriert, dass SHC in Signalwege eingreift, die an der Entwicklung von malignen Zellen beteiligt sind. C-Myc Aktivierung (Gotoh et al., 1997), Signalwege der Apoptose (Sakai et al., 2000; Friedmann et al., 1996), Zytoskelettorganisation und mitogene Signale über Ras. Widersprüchliche Veröffentlichungen zeigen SHC zum einen als Substrat von FAK, zum anderen aber gibt es Berichte über unabhängige Rollen von FAK und SHC in fokalen Adhäsionen und der Motilität von Zellen (Wary et al., 1996; Barberis et al., 2000).

### Extracellular signal-related kinase (*ERK*)

Im ERK Signalweg laufen viele Stimuli von wichtigen Integrin-Signalträgern, wie FAK oder SHC, zusammen (siehe Abbildung 2-8). Auf diese Weise wird über diesen Weg fast jede wichtige zelluläre Aktivität gesteuert (Howe et al., 2002). Der FAK Signalweg wird von den meisten Integrinen genutzt. Der Signalweg über SHC wird nur von einem kleinen Teil der Integrine, nämlich  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 1$  und  $\alpha v \beta 1$ , genutzt. Wie groß der Einfluss jedes dieser Signalwege auf ERK ist, hängt entscheidend vom jeweiligen Zelltyp ab und wie stark oder schwach die Zelle an das Substrat anhaftet. SHC scheint ERK sehr stark nach dem ersten Zell-Matrixkontakt zu aktivieren; die eher langsame Aktivierung von ERK durch FAK scheint eher zu anhaltender ERK Aktivierung zu führen. (Wary et al., 1996).

Während Melanozyten eine sehr geringe ERK-Aktivität besitzen, ist in Melanomzelllinien ERK konstitutiv aktiv (Satyamoorthy et al., 2003). Damit geht auch die verminderte Fähigkeit der Melanomzellen einher, sich zu differenzieren (Englaro et al., 1998; Kim et al., 2002). Verantwortlich für die konstitutive ERK Aktivierung sind multiple Komponenten. Während die Ras-Isoformen im malignen Melanom eher selten verändert vorliegen (van Elsas et al., 1995; Herlyn and Satyamoorthy 1996) ist B-Raf in mehr als 66 % mutiert (Davies et al., 2002). Viele autokrine Wachstumsfaktoren (bFGF, HGF, IGF,  $\alpha$ -MSH, EGF, SCF, NGF) werden während der malignen Transformation von Melanozyten sezerniert. Dies trägt zusätzlich zum hohen Aktivitätslevel von ERK in Melanomen bei (Mattei et al., 1994; Lazar-Molnar et al., 2000; Satyamoorthy et al., 2001). Mit der Hochregulation der ERK-Expression geht schließlich auch eine verminderte Fähigkeit der Zellen einher, sich zu differenzieren.

### *Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)*

Auch für den EGFR Rezeptor wurde gezeigt, dass er durch Integrine aktiviert wird. Durch Signale der extrazellulären Matrix vermitteln diese Rezeptortyrosinkinasen Zelladhäsion abhängiges Wachstum und Proliferation. EGFR Aktivierung führt letztendlich zur Aktivierung des ERK-1/MAP-Kinase Signalweges und führt so die Zellen in die S-Phase des Zellzyklusses (siehe Abbildung 2-8). Die vier, miteinander verwandten EGFR Rezeptoren EGFR/ErbB1, EGFR/ErbB2, HER-3/ErbB3 und HER-4/ErbB4 bilden miteinander Homo- und Heterodimere und



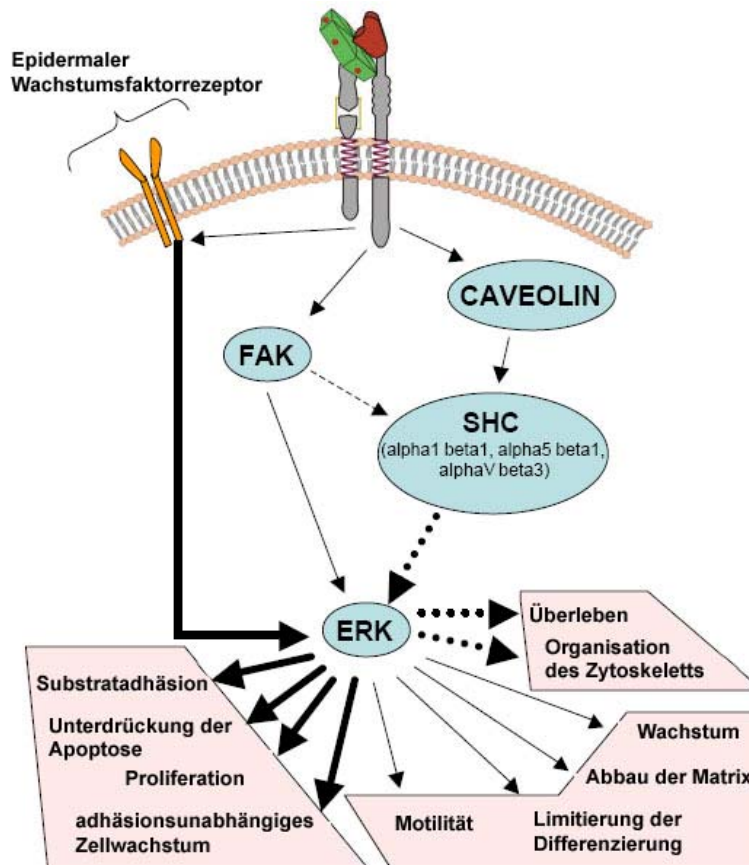
reagieren sehr spezifisch auf extrazelluläre Signale (Arteaga, 2002; Prenzel et al., 2000). Durch Signale von außen dimerisiert und autophosphoryliert EGFR. Es bindet daraufhin an viele Proteine, welche die MAPK - und andere Signalwege stimulieren. Viele Studien konnten zeigen, dass EGFR abhängige MAPK Aktivierung wichtige Proteine der Apoptose beeinflusst, was das kontrollierte Absterben von Zellen, auch nach Ablösung von ihrem Substrat, erschwert. (Jost et al., 2001; Marani et al 2004).

Die Überexpression und Mutationen des EGF-Rezeptors führen häufig zu Brustkrebs, Eierstockkrebs, Lungenkrebs oder Prostatakarzinomen (Prenzel et al., 2000). In Melanomzellen, sowie im Urin von Melanompatienten, findet man häufig erhöhte Konzentrationen des EGFR Liganden TGF-alpha (Gordon-Thomson et al., 2001). Fehlerhafte Expressionen von EGFR werden auch in Melanomen im Endstadium gefunden. (Kraehn et al., 1995; Kari et al., 2003). Weiterhin wurden in immunhistochemischen Studien die Überexpression der Onkogene c-erbB2 und c-erbB3 in kutanen und metastasierenden malignen Melanomen entdeckt (Bodey et al., 1997). In Melanozyten ist EGFR nur in geringen Mengen vorhanden und TGF-alpha bewirkt hier keine Induktion von Wachstum der Zellen *in vitro* (Gordon-Thomson et al., 2001).

### *Caveolin*

Caveolin ist ein (siehe Abbildung 2-8). 22 kDa schwerer Transmembranadapter, der eine ganze Reihe von Oberflächenrezeptoren mit intrazellulären Signalwegen verbindet. Die Integrin-Caveolin Interaktion wird vom Urokinaserezeptor uPAR reguliert und stabilisiert (Wei et al., 1999;). Es wurde gezeigt, dass Caveolin ständig mit beta1 Integrinen assoziiert ist (Wary et al., 1998; Wary et al., 1996). Eine Unterdrückung der Expression von Caveolin in Nierenzellen beeinflusst die Bindung von Liganden an Integrine zwar nicht, jedoch gehen keine Signale mehr von den beta1 Integrinen aus und das wiederum hat zur Folge, dass fokale Adhäsionskontakte verloren gehen.

In Melanomen ist nur sehr wenig bekannt über Caveolin. Wenn man jedoch die Einflüsse dieses Proteins auf die unterschiedlichen tumorassoziierten Proteine, wie Src Kinasen, den Ras-ERK Signalweg und uPar bedenkt, könnte man sich auch hier eine potentielle Rolle in der Melanomentwicklung vorstellen.



**Abbildung 2-8**

Schematische Darstellung des Signalweges von den Integrinen und EGFR zur ERK-Signalkaskade und die daraus resultierenden Reaktionen der Zelle.

### 2.5.2 Signalkaskaden bei der Zell-Zelladhäsion ausgehend von Cadherinen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Verkürzung des klassischen P-Cadherins in Melanomzellen. Im folgenden Abschnitt wird deshalb kurz dargestellt, was über Cadherine bisher bekannt ist. Cadherine bilden Komplexe mit Cateninen, welche die Cadherine funktionell an das Aktinzytoskelett binden (Kemler 1993). Änderungen in der Zusammenstellung von Cadherin-Catenin Komplexen beeinflussen die Signalwege, die von den Cadherinen in die Zelle geleitet werden. Es wird vermutet, dass Wnt-Signale den Cadherin-Catenin Komplex an der Membran stabilisieren und so die Cadherin abhängige Adhäsion in manchen Zelllinien verstärkt (Bradley et al., 1993; Hinck et al., 1994). Einige Signalwege innerhalb der Zelle sind auch für die Auflösung des Komplexes verantwortlich, zum Beispiel die Expression von aktiviertem Cdc42 oder Tyrosinphosphataseinhibitoren (Ozawa and Kemler, 1998a). Die physiologische Rolle dieser Auflösung ist jedoch noch nicht geklärt. Die kleinen GTPasen Rac,

Rho und Cdc42 sind indirekt an der Cadherin vermittelten Zelladhäsion beteiligt, weil sie auf das Aktinzytoskelett einwirken; aber auch bei der Überexpression von konstitutiv aktivem Rac beobachtete man eine Akkumulation von E-Cadherin, Beta-Catenin und Aktin an Zell-Zellkontakten in Epithelien, während dominant-negatives Rac den Gegensätzlichen Effekt auf die Adhäsion hat (Kaibuchi et al., 1999; Takaishi et al., 1997).

alpha-Catenin interagiert, neben Aktin, mit einer Anzahl von Aktin bindenden Proteinen, wie alpha-Actinin, Vinculin und ZO-1 (Knudsen et al., 1995; Rimm et al., 1995; Watabe-Uchida et al., 1998; Imamura et al., 1999).

Vinculin ist dabei wichtig, E-Cadherin in die zonula adherens in Epithelien zu rekrutieren, spielt jedoch keine Rolle bei der Adhäsion selbst (Watabe-Uchida et al., 1998). Die ZO1-Bindestelle an alpha-Catenin ist wichtig für die Stärke der Cadherin vermittelten Adhäsion in Zellen, die nicht-epithelialen Ursprungs sind, scheint aber nicht wichtig für die Funktion von E-Cadherin in *adherens junctions* in Epithelzellen zu sein (Imamura et al., 1999).

Auch die Tyrosinphosphorylierung des Cadherin-Catenin Komplexes ist bei der Regulation der Adhäsion von Bedeutung (Daniel and Reynolds 1997). Bei Phosphorylierung von Beta-Catenin wurde eine Inhibierung der Catenin vermittelten Adhäsion beobachtet (Shibamoto et al., 1994).

Das Protein p120ctn bindet an einen zytoplasmatischen Teil der Cadherine an dem nicht die Catenine binden (Thoreson et al., 2000). P120ctn scheint die Zelladhäsion in manchen Zellen zu unterbinden und in manche zu stärken, weil zu einem beobachtet wurde, dass die Expression von mutiertem p120ctn zu einer Verfestigung der Zelladhäsion führt (Ohkubo and Ozawa 1999) zum anderen wurde gezeigt, dass die Entkopplung von p120ctn von E-Cadherin durch Mutation an der zytoplasmatischen Domäne, eine Verstärkung der Adhäsion hervorruft (Thoreson et al., 2000).

### **2.6 Das Protein MIA**

MIA ist auch unter dem Namen CD-RAP (*cartilage-derived retinoic acid sensitive protein*) bekannt, und wird normalerweise in Chondrozyten exprimiert (Dietz und Dandell 1996). Pathologisch jedoch wird es im Melanom gebildet (Blesch et al., 1994). Ursprünglich wurde das Protein aus der Melanomzelllinie HTZ19 isoliert.

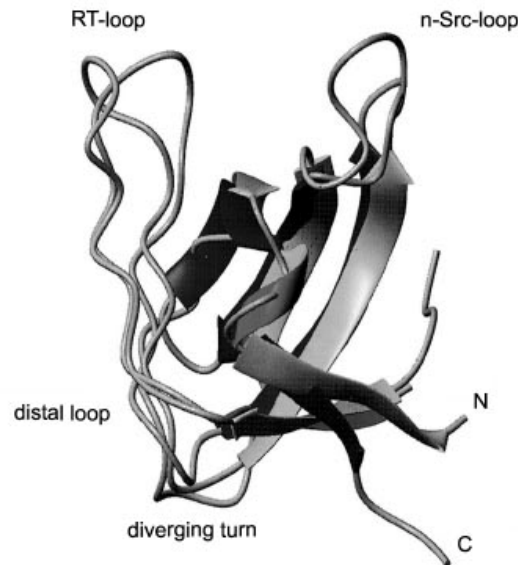
Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Hirnmetastase mit sehr langsamer Progression (Bogdahn et al., 1987). MIA zeigte nach der Reinigung aus dieser Zelllinie eine starke Proliferationshemmung (Bogdahn et al., 1989). Diese Eigenschaft gab ihm den Namen „*melanoma inhibitory activity*“ (MIA). Weiterhin wurde bewiesen, dass MIA die DNA Synthese inhibiert und ein Abrunden der Zellen verursacht (Blesch et al., 1994).

Das MIA-Gen im Menschen liegt auf Chromosom 19 (q13.32-q13.33 (Kohler et al., 1996) und in der Maus auf Chromosom 7 (19q13.2) (Dietz et al., 1996; Bosserhoff et al., 1996). Der melanomspezifische MIA-Promotor und zellspezifische Transkriptionsfaktoren regulieren die MIA-Expression. Der MIA Promotor enthält das hochkonservierte Promotorelement HCR (*highly conserved region*). Der Transkriptionsfaktor HMG1 und p65, einem Protein der NfkapppaB Familie, sind wichtige Faktoren in der Regulation der MIA-Expression. Dabei interagiert der Transkriptionsfaktor HMG1 mit p65, und bindet an den MIA-Promotor. (Poser et al., 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Melanomspezifische MIA-Expression auch durch ein negatives cis-regulatorisches Element in der 5' HCR Region kontrolliert wird. Der T-Zell Faktor bindet (TCF) bindet dabei als Negativregulator zusammen mit dem Ko-Repressor CtBP1 an das Promotorelement von MIA und unterdrückt dadurch dessen spezifische Expression in Melanozyten (Poser et al., 2002).

MIA wird als Präprotein synthetisiert und enthält 131 Aminosäuren. Es wird aus der Zelle über eine Signalsequenz von 24 Aminosäuren hinaus transportiert. Das native, prozessierte Protein hat 107 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 11 kDa. MIA wird in hohen Konzentrationen in allen Melanomzelllinien gebildet und in eher geringen Konzentrationen in gutartigen melanozytären Nävi. In normalen Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten wird MIA nicht gefunden (van Groningen et al., 1995; Bosserhoff et al., 1996). Durch rekombinantes MIA kann die Invasion von Melanomzellen *in vitro* zu 40-60% gehemmt werden (Bosserhoff et al., 1996). Wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird, resultiert diese Hemmung aus der Blockierung der Zelladhäsion.

Die dreidimensionale Struktur von MIA besitzt eine starke strukturelle Homologie zu SH3-Domänen. Insgesamt ist MIA aus 7 antiparallelen Beta-Strängen aufgebaut. Diese bilden dann zwei antiparallele Beta-Faltblattstrukturen, eingebettet von zwei Loop-Strukturen, welche auch in SH3-Domänen vorkommen.

Die N- und C-Termini von MIA liegen auf der gegenüberliegenden Seite der potentiellen Bindungstasche, in enger räumlicher Nähe zueinander. Abbildung 2-9 zeigt die dreidimensionale Struktur von MIA (Stoll et al., 2001).

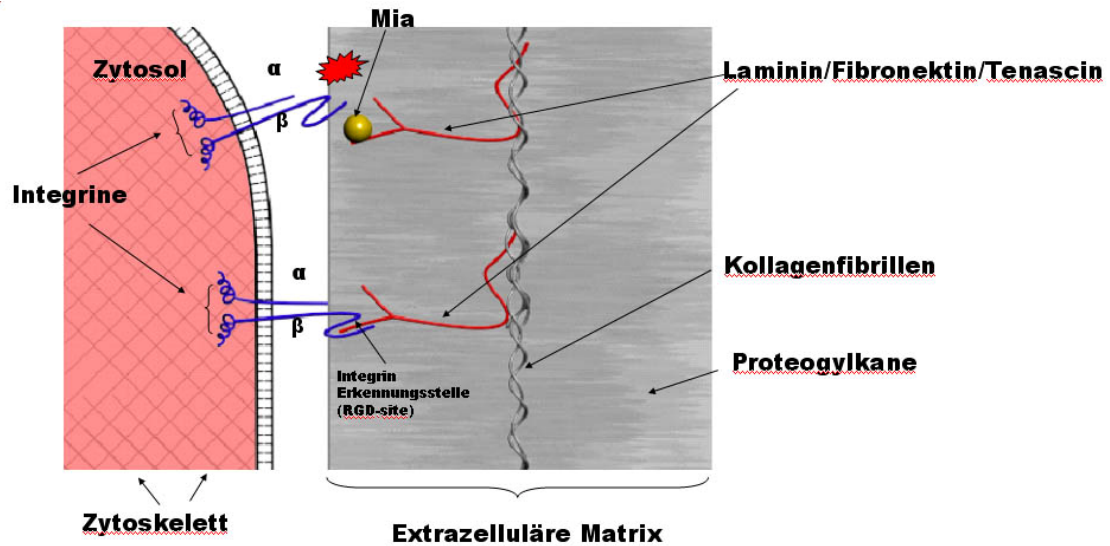


**Abbildung 2-9**

Dreidimensionale Struktur des Proteins MIA (Stoll et al., 2001)

### 2.6.1 Die Rolle von MIA bei der Zelladhäsion im malignen Melanom

Bisherige Studien haben gezeigt, dass der autokrin produzierte Faktor MIA das Ablösen der Zellen von extrazellulären Matrixmolekülen, wie Fibronectin, fördert (Bosserhoff et al., 2003). Dabei bindet es an die Makromoleküle und maskiert an diesen Molekülen unter anderem spezifische Aminosäuresequenzen (RGD, Arginin- Glycin- Asparaginsäure), die für die Bindung an Integrine verantwortlich sind (siehe Abbildung 2-10). Im Maus- und Hamstermodell konnte gezeigt werden, dass MIA *in vivo* die Metastasierung unterstützt, indem es einer Tumorzelle das Durchdringen des umliegenden Stromas ermöglicht (Bosserhoff et al., 2002). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass MIA darüber hinaus direkt und spezifisch an bestimmte Integrine binden kann und dadurch das Verhalten der Zellen eventuell durch Beeinflussung der Signalwege zusätzlich modulieren kann.



**Abbildung 2-10**

**Schematische Darstellung von der bisher bekannten Wirkungsweise von MIA zwischen Zellen und den Makromolekülen der extrazellulären Matrix.**

MIA bindet unter anderem an die RGD-Bindestelle der Proteine der extrazellulären Matrix und maskiert sie, so dass diese nicht mehr an die Integrine binden können. Dadurch erfolgt eine Ablösung der Zellen von ihrem Substrat.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Allgemeine Materialien

Amersham, Braunschweig	[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-dATPs, 3000Ci/mmol, NICK™-Columns, Streptavidin Sepharose High Performance
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round- Bottom Tube
Behrens, Hamburg	Agar
Biochrom AG, Berlin	Phenolrot
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME USA	SeaKem® LE agarose
Cell Signaling Technology, Inc., Berverly, MA, USA	Anti P44/42 MAP-Kinase Antikörper 1:1000 Anti Phospho-p44/42 MAP-Kinase Antikörper 1:1000 Anti p38 MAP-Kinase Antikörper 1:1000 Anti JNK MAP-Kinase Antikörper 1:1000
Chemicon International, Inc.Temecula, CA, USA	Anti-Integrin alphav beta3 (MAB 1976)1:100 Anti-Integrin alpha2 (Ab 1944-20) 1:500 Anti-Integrin alpha3 (AB 1948-20) 1:500 Anti-Integrin alpha4 (AB 1924) 1:100 Anti-Integrin alpha5 (AB 1928) 1:500 Anti-Integrin beta3 (MAB 1957) 1:500 Anti-Integrin beta1 (Ab1952-20) 1:500
Corning Incorporated Costar, New York	High Binding Stripwell Plates
DakoCytomation, Dänemark	Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin 1:1000, Streptavidin/Cy5 Antikörper 1:100

### 3 Material und Methoden

---

Humphries, Martin	Rekombinante alpha4 beta1 1:100, Rekombinante alpha5 beta1 1:500, Fibronektinfragment 50K 1µg/ml, Fibronektinfragment H/120 1µg/ml, Anti- 12G10 Antikörper 1:100
Invitrogen, California, USA	SuperScript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2, Ready- Load™ 100 bp DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1/ Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent, Geltrocknungkit, Silverexpress Silver Staining Kit
MWG Biotech, Martinsried	Oligonukleotide
Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	Anti-Tyrosinase Antikörper 1:20
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	DMEM, RPMI, Fötales Kälberserum, Trypsin, PBS, Penicillin/ Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit, Fluorescein konjugiertes Neutravidin
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit
Riedel de Haen, Seelze	Ethanol, Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	Restriktionsendonukleasen, Taq-Polymerase, Ethidiumbromid, RNase A, SuRE/ Cut Buffer for Restriktion Enzymes, COMPLETE- Proteinaseinhibitormix, Nonidet® P40, MIA- ELISA Kit, RTS Proteomaster, RTS Avi-Tag Biotinylierungskit, ABTS (2,2'- azino-di-[3- ethylbenzthiazolinsulfonat], Substrat für Enzymimmunoassays mit Peroxidase als Markerenzym)
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend



Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg Sigma, St. Louis, USA	Anti-Phospho-Paxillin (Tyr 118) 1:1000 Anti-Tyrosinase 1:500 Acrylamid 40% Lösung, Bromphenolblau, Trypsin, BSA, TEMED, Monoclonal Anti- $\beta$ - Actin Antikörper 1 :5000
Sigma Genosys, Cambridge, England Stratagene, Heidelberg	Oligonukleotide  Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent Cells
Takara, Japan Transduction Laboratories, Lexington, England	Anti P,E,N-Cadherin Antikörper 3 $\mu$ g/ml Anti- N-Cadherin Antikörper 1:2500, Anti-E- Cadherin Antikörper 3 $\mu$ g/ml, Anti-P-Cadherin Antikörper 1:250, Anti-pp120 Antikörper, Anti- VASP Antikörper, Anti-Plakoglobin Antikörper
Upstate Technology, New York	Anti-FAK Antikörper 1 $\mu$ g/ml Anti-Phospho-FAK (Tyr 397) 1:1000 Anti-ILK Antikörper 2 $\mu$ g/ml Anti-SHC Antikörper 1 $\mu$ g/ml Anti-Phospho-SHC Antikörper (Tyr 317) 1:500
Whatman International Ltd, Maidstone, England Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track- Etch Membrane BCIP/NBT Substrate Kit

#### 3.1.2 Geräte

##### Blotapparaturen:

Whatman Biometra, Göttingen	Minigel Twin, Fastblot B34
-----------------------------	----------------------------

##### Gelelektrophoreseapparaturen:

Amersham pharmacia biotech BioRad, München	Elektrophoresis Power Supply EPS 301 Wide Mini Sub® Cell GT
-----------------------------------------------	----------------------------------------------------------------

##### Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact
--------------------	------------------------------------------------------------

#### Mikroskope:

Leitz, Wetzlar	Labovert FS, Aristoplan
Zeiss, Jena	Axiovert 10, ICM 405

#### Spannungsgeräte:

BioRad, München	Modell 200/2.0 power supply, Consort E455
-----------------	-------------------------------------------

#### Waagen:

Sartorius, Göttingen	R160P, L2200S
----------------------	---------------

#### Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus
Hereaeus, Hanau	Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt	Tischzentrifuge

#### Sonstige Geräte:

Bachofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Beckton Dickinson	Facs Calibur
Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
Kendro Laboratories, Hanau	Herasafe, Sicherheitswerkbank, KS, Zellinkubator CO2- Auto- Zero
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cyclers PTC- 200
Tuttnauer/Systec, Wettenberg	Autoklav 2540 EK
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

### **3.1.3 Organismen**

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF'	Ultracompetent Escherichia Coli
--------------------------------	---------------------------------

### 3.1.4 Säugerzelllinien

A431	Humane Keratinozytentumorzelllinie, ATCC CRI-1555
HMB2	Melanomzelllinie, gewonnen aus einer humanen Melanommetastase
HMB2 -5	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 -8	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2lacZ3	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit LacZ
HT29	ATCC Nr.: HTB-38, Humane Kolonkarzinom Zelllinie
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Sk Mel 3	ATCC Nr.: HTB-69, Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms
Sk Mel 28	ATCC Nr.: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mausfibroblasten	Fibronektin +/+ und Fibronektin -/- Mausfibroblasten
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut

#### Vektoren:

pCMX-PL1	Konstrukt aus pUC19 und CDM8
pcDNA3.1	Expressionskonstrukt mit Neomycinkassette
pIVEX 2.3 MCS	Expressionsvektor für RTS Transkriptions-/Translationssystem (Roche)

### 3.1.5 Oligonukleotide

Primer für RT- PCR und quantitative PCR

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, England synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in H<sub>2</sub>O hergestellt und bei -20°C gelagert.

#### Genomische Primer zur Analyse von P-Cadherin

Exon/Name	Sequenz
P-Cad Exon1 for	GTA CTGAGGAGGCTGAGGAG
P-Cad Exon1 rev	GCAGAGAGTGAAGGAGGCTG
P-Cad Exon2 for	GTCGCGGCAGCTGCTTCAC
P-Cad Exon2 rev	GATGTCATAGGCGCTCTGCTG
P-Cad Exon3 for	GTCCATGAATGTCTATGATC
P-Cad Exon3 rev	GACTAACACTACCTCCTCTG
P-Cad Exon 4 for	CAATAGGCTCATCTAGGTCTC
P-Cad Exon 4 rev	CAGTAGCAAGAAATCTCATGC
P-Cad Exon 5+6 for	CTGTT CAGTGAGCAGATTCTC
P-Cad Exon 5+6 rev	CAGAGCTCTGCTCTAGGATC
P-Cad Exon7 for	GTAGACAGGGCTGGAGTTG
P-Cad Exon7 rev	GCTTCTGCTCTCAGAGTCAG
P-Cad Exon 8 for	CACCCATGAGCCAGTGCTTC
P-Cad Exon 8 rev	CAGCCATAGTGCTGAGACTG
P-Cad Exon9 for	CATCCTGCCGCTGTGTATAC
P-Cad Exon9 rev	CAGTGACTCTTACCTATTTATG
P-Cad Exon10 for	CATCTCAACTGTCCTGCACAG
P-Cad Exon10 rev	CAATCTCTATGGTAATCAGAAC
P-Cad Exon 11 for	GTAGACAGGGCTGGAGTTG
P-Cad Exon 11 rev	GCTTCTGCTCTCAGAGTCAG
P-Cad Exon12 for	GTCTTGAGAGGTGAGAGCTG
P-Cad Exon12 rev	GGTTCTAGAGGAGATCATTGTC
P-Cad Exon13 for	CTAATCAATGATCTGTTCAC TC
P-Cad Exon13 rev	GCTCAAGGTAGAATCCAGTC
P-Cad Exon 14 for	CTGAGTGAGGACATCTGCAG
P-Cad Exon14 rev	CAAAGAGACTACAGCAATGGAC
P-Cad Exon15for	CTGTGACATCATCTGTCTTG
P-Cad Exon 15 rev	CATGCTTGTTCTCCTGTGTG
P-Cad Exon16 for	GCACTTGCTGTCTGCTGGTC
P-Cad Exon16 rev	CTTGGAGATGCTCTGTGGC

#### cDNA Primer zur Analyse der P-Cadherin mRNA

Exon		Name	Sequenz
forward primer			
1	exon 4	p-Cad for 387	AGAGAGATTGGGTGGTTGCTC
2	exon 7	p-Cad for 896	ACAGGCACCATCAGCGTCA
3	exon 8	p-Cad for 947	CCAGGCCACAGACATGGAT
4	exon 8	p-Cad for 986	GGCAGTGGCAGTAGTGGAGA
5	exon 10	p-Cad for 1332	CAACCTCCACAGCCACCATA
6	exon 10	p-Cad for 1372	TTGTCCCACCCTCCAAAGTC
7	exon 12	p-Cad for 1663	GGGAACCCTTCTGCTAACACT
8	exon 15	p-cad for 2139	TCCCAGAAGATGACACCCGT
9	exon 16	p-Cad for 2332	TTGGTGTTCGACTATGAGGG
reverse primer			
10	exon 8	p-Cad rev 969	GCCTGGATGGTCAGTGTGTA
11	exon 9	p-Cad rev 1119	CGTCCAGATCAGTGACCGT
12	exon 10	p-Cad rev 1320	AGGTTGGGAGCTTCAGCA
13	exon 11	p-Cad rev 1541	TGTGACCTGCCTACTGTCT
14	exon 11	p-Cad rev 1597	CACAAACTGCTCATCCTCAC G
15	exon 12	p-Cad rev 1679	TTAGCAGAAGGGTTCCCGTG C
16	exon 12	p-Cad rev 1751	CAGGGCTTTGGTTGCAGATG G
17	exon 14	p-Cad rev 2114	TCCGCTTCTTTCTCACCAACA
18	exon 15	p-Cad rev 2259	TTCATCTGGGTTGGCTGG
19	exon 16	p_Cad rev 2437	CCCACCTCGTTCAGATAATCG
20	3'UTR	p-Cad rev 2726	GGCTAAGGAAGCAACCACTC T
21	3'UTR	p-Cad rev 3069	CGATTGTCCTCACCCCTTCATC

#### Primer zur Klonierung von P-Cadherin

Exon	Name	Sequenz
22 Exon 1	P-Cadh for 42	GACGAATTCTCTCT GCAGCCATGG
23 Exon 10	P-Cad 1445 rev in exon 10	GACGAATTCCTACT TGTCAGGGTCTTC
24 Exon 14	P-Cad rev vor TM	GACGAATTCCTAGC AGGTTTCGACATG

#### Primer zur Klonierung von Avi-MIA

Name	Sequenz
25 Avi-MIA Fxa for	GCTACCATATGGAGGGTTTAAA CGATATTTTCGAGGCTCAGAAA ATCGAATGGCACGAAATCGAAG GCCGCGGTCCTATGCCCAAGC TG
26 MIA rev	

#### Primer für die 3'RACE

Name	Sequenz
27 T17 Adapterprimer	GACTCGAGTCGACATCGATTTT TTTTTTTTT TTTT
28 Adapterprimer	GACTCGAGTCGACATCG

#### **3.1.6 Peptide**

Name	Sequenz
25 RGD-Peptid	GRGDST (1µg/ml)

## **3.2 Medien, Antibiotika und Puffer**

### **3.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen**

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Substanzen wurden in dest.H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert Für Platten: + 15g/l Agar Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin
DMEM	Pulver wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, der pH mit NaHCO <sub>3</sub> auf 7,3 eingestellt, und sterilfiltriert; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot
Einfriermedium	Pro 100ml: 50ml DMEM (mit 10% FKS) 30ml FKS 20ml DMSO

### **3.2.2 Antibiotika**

Ampicillin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ ml in dest. H <sub>2</sub> O (-20°C)

### **3.2.3 Puffer und Lösungen**

RNase A Lösung	10 mM Tris/ HCl pH 7,0 10 mg/ ml RNase A bei 95°C 10min
----------------	---------------------------------------------------------------

#### Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (v/v) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H <sub>2</sub> O bidest

#### Lösungen für die Zellkultur:

PBS (Phosphate buffered saline)	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> wurde in destilliertem Wasser gelöst; der pH-Wert mit NaHCO <sub>3</sub> auf 7,6 eingestellt; die Lösung sterilfiltriert
---------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Lösungen für die Plasmidisolierung aus E.coli:

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60ml 5 M NaOAc 11,5ml Eisessig 28,5ml H <sub>2</sub> O

#### Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung):

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED



### 3 Material und Methoden

---

4%-Sammelgel

10% (v/v) Acrylamid:Bis 40%

12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8

0,1% (v/v) SDS

0,05% (v/v) APS

0,05% (v/v) TEMED

#### Lösungen für ELISA-Experimente:

Bindungspuffer

150mM NaCl

25 mM Tris/HCL pH 7,5

1 mM MnCl<sub>2</sub>

0,1% BSA

Blockpuffer

150mM NaCl

25 mM Tris/HCL pH 7,5

5% BSA

#### Lösung für Ko-Immunpräzipitation:

Bindungspuffer

150 mM NaCl

20mM NaPO<sub>4</sub>

#### Lösungen für Western Blot:

Western Blot-Transferpuffer

10% (v/v) Methanol

25 mM Tris

190 mM Glycin

PBS (10x)

80g/l NaCl

2,0g/l KCl

14,4g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,4g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert

Blockierungslösung

3% BSA in PBS

#### Lösung zur Isolation von Gesamtprotein:

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1% Nonidet® P40
	0,5% Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS

### **3.3 Methoden**

Alle molekularbiologischen Arbeiten, Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

#### **3.3.1 Arbeiten mit Escherichia Coli**

##### 3.3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Der Bakterienstamm XL2-Blue wurde sowohl auf festen Nährboden als auch in Schüttelkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium beziehungsweise die Nährplatte je nach Resistenzgen auf dem Plasmid, mit einem Selektionsantibiotikum versetzt (Ampicillin beziehungsweise Kanamycin). Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

##### 3.3.1.2 Transformation von E.coli

Zur Transformation kompetenter E.coli wurden je 100 ng Plasmid- DNA zu 100µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock kühlte man die Bakterien eine Minute auf Eis ab, gab pro Ansatz 500µl LB Medium zu und lies die Kultur 60 Minuten lange bei 37°C unter Schütteln anwachsen. Die transformierten E.coli wurden dann fünf Minuten bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid- DNA vorlag.

#### 3.3.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

E.coli Bakterien können durch Behandlung mit Kalziumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Bakterienkultur (XL-2) wurde in LB-Medium bei 37°C so lange kultiviert, bis die Bakterienlösung eine optische Dichte ( $OD_{650}$ ) von 0,2-0,5 hatte. Die Zellen wurden nach Erreichen der Zelldichte für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 4000 UpM über 10 min bei 4°C geerntet und das Pellet in 20 ml eiskalter 50mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (4000 UpM, 10min, 4°C) und anschließend in 4 ml eiskalter 50mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Für die Lagerung der Bakterien bei -80°C wurden 3,4ml der Bakteriensuspension (in 50 mM Kalziumchlorid-Lösung) mit 0,6 ml sterilem Glycin vermischt und jeweils 200µl der Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Es wurden 3ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und 250 rpm über Nacht auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5ml der Schüttelkultur wurden bei 4000 U/ min. abzentrifugiert, das Kulturmedium entfernt und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung I (siehe 2.2.3 Lösungen für Plasmidisolierung) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis werden 200µl der Lösung II zur Lyse der Bakterien zugegeben und zur Durchmischung das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglichte die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch SDS denaturiert, DNA durch das alkalische Milieu. Um denaturierte Proteine zu entfernen, folgte die Zugabe von 150µl der Lösung III und eine 3-5-minütige Inkubation auf Eis. Die Sedimentation der dabei präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 U/ min für 5 Minuten. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl 100%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde 10 Minuten auf Eis

inkubiert und 10 Minuten bei 13000 U/ min abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird verworfen und das Plasmid- DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wird das Pellet in 10µl eines H<sub>2</sub>O und RNase Mixes (120µl H<sub>2</sub>O + 5µl RNase A) resuspendiert und bei 37°C etwa 20 Minuten geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

#### 3.3.1.5 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midipräparation)

Für die Midipräparation wurden 50ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit 50µl Bakteriensuspension aus der Minipräparation angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen beziehungsweise Promega nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit 500µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei –20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen etwa bei 150 bis 250µg Plasmid DNA pro 50ml Bakterienkultur.

#### 3.3.1.6 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.

Die Isolierung erfolgte mittels des Quiaamp DNA Mini Kits von Quiagen. Konfluent gewachsene Zellen wurden aus T75 Zellkulturschale abgeerntet und in 200 µl PBS resuspendiert. Danach wurde 20 µl Proteinase K (Quiagen) hinzugegeben. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Protokoll von Quiagen. Für die Isolierung genomischer DNA aus Blut wurden jeweils 200 µl Blut verwendet und nach Protokoll von Quiagen verfahren.

### 3.3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.2.1 DNA- und RNA Methoden

##### 3.3.2.1.1 *Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte meist in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5U des entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1-2h bei der optimalen

Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### 3.3.2.1.2 *Gelelektrophorese von DNA*

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-gelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte nachträglich in Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30min. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente konnte aufgrund eines ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt werden.

#### 3.3.2.1.3 *Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten*

Die DNA-Fragmente wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

#### 3.3.2.1.4 *DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten  $< 1$  gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD<sub>260nm</sub> Einheit = 50µg/ ml dsDNA, Plasmide und 40µg/ ml RNA.

#### 3.3.2.1.5 *Reverse Transkription*

Für die Reverse Transkription wurden 2µl RNA, 4µl First strand buffer (5x), 2µl DTT (0,1M), 1µl dNTP (10mM), 1µl dN6 random primer, 9µl H<sub>2</sub>O für 5min auf 70°C erhitzt, nach Abkühlung auf ca. 50°C Zugabe von 1µl Superscript II und Inkubation des Reaktionsmix bei 37°C für 1h. Die Inaktivierung der Superscript II erfolgte bei 70°C für 10min. Die Zugabe von 1µl RNase A erfolgte über 30min bei 37°C.

#### 3.3.2.1.6 *Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragments wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet. Die Reaktion erfolgte üblicherweise in einem Volumen von 50µl. Eingesetzt wurde 1x Taq-Polymerase-Puffer, je 1µg Primer, 1mM dNTPs und 5U Taq-Polymerase. Die Amplifikation der cDNA erfolgte durch 33 repetitive Zyklen: Denaturierung (45s, 94°C), Annealen (30s, 58°C), und Elongation (5min, 72°C).

#### 3.3.2.1.7 *3'RACE (rapid amplification of cDNA ends)*

Die 3'RACE wurde durchgeführt, um das 3'Ende der P-Cadherin cDNA zu analysieren. Dafür wurde mit 1 µg Gesamt-RNA aus Melanomzelllinien mit 1µl des T 17 Adapterprimers ((20), siehe 3.1.5) 2 Stunden bei 39°C mit der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen Life Technologies) eine reverse Transkription durchgeführt. Anschließend wurde eine PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:

94 °C 3 Minuten

72°C 3 Minuten

94 °C 30 Sekunden

59°C 1 Minute

72 °C 2 Minuten

35 Zyklen

72 °C 10 Minuten.

Es wurde die Taq-DNA-Polymerase der Firma Roche verwendet. Die amplifizierte DNA wurde im 1,5% Agarosegel aufgetrennt.

#### 3.3.2.2 RNA-Methoden: RNA Isolierung aus Säugerzellen bzw humanen Geweben

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 3.3.2.3 Proteinchemische Methoden

##### 3.3.2.3.1 *Rekombinante zellfreie Herstellung von biotinyliertem MIA*

Siehe Ergebnisteil Kapitel 4.

#### 3.3.2.3.2 *Herstellung von Gesamtproteinextrakten*

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Säugerzellen abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 4000rpm für 5min wurde das Zellpellet in 200µl RIPA Puffer lysiert und danach 15 min bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die in Puffer gelösten Proteine konnten dann durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Die Überstände der Zellkulturlinien wurden zentrifugiert (5 Minuten bei 4000rpm) und die Proteine im SpeeVak bei Vakuum konzentriert.

#### 3.3.2.3.3 *Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen*

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Smith et al. unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits (Pierce) durchgeführt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  durch Proteine (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchromsäure (BCA) einen lila Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann.

Zu 5µl Gesamtproteinlösung bzw. 1µl Kernproteinlösung mit 4 µl Wasser, wurden 200 µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und ca. 10 Minuten bis zur Entwicklung einer lila Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562 nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA-Standards in Proteinkonzentrationen umgerechnet wurden.

#### 3.3.2.3.4 *SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese*

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid Gelen aufgetrennt werden, da durch die Anlagerung von SDS-Molekülen deren Tertiär- und Quartärstruktur zerstört wird und die Proteine linear vorliegen. 40 µg Proteinproben wurden



jeweils in 1x Roti-Load 10min bei 70°C aufgekocht und anschließend bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> durch SDS-PAGE auf 8 % bis 12 % PAA Gelen aufgetrennt.

#### 3.3.2.3.5 *Western Blot*

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden diese auf PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurden die SDS-PAGE Gele nach dem Gellauf zusammen mit der PVDF-Membran 10min in 1x Western-Blot Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm<sup>2</sup>) auf die Membran übertragen.

#### 3.3.2.3.6 *Proteindetektion auf Western-Blots*

Die PVDF-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1-2h bei RT in PBS mit 3% BSA inkubiert und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:3000-1:10000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3x 10min mit PBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des 1. Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) 2. Antikörper (1:8000), der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen (3x 10min mit PBS) und das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und 10 Minuten bis zu 2 Stunden inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

Beim Far-Western Blot wurde statt dem 1. Antikörper das biotinylierte MIA verwendet. Der 2. Antikörper war Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase.

Folgende Antikörperkonzentrationen wurden verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-FAK Antikörper	1µg/ml
Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin,	1:1000
Anti JNK MAP-Kinase Antikörper	1:1000
Anti- N-Cadherin Antikörper,	1:2500
Anti p38 MAP-Kinase Antikörper	1:1000
Anti P44/42 MAP-Kinase Antikörper	1:1000
Anti Phospho-p44/42	1:1000
Anti-12G10 Antikörper	1:100
Anti-E-Cadherin Antikörper,	3µg/ml
Anti-FAK Antikörper	1µg/ml
Anti-ILK Antikörper	2µg/ml
Anti-Integrin alpha2 (Ab 1944-20)	1:500
Anti-Integrin alpha3 (AB 1948-20)	1:500
Anti-Integrin alpha4 (AB 1924)	1:100
Anti-Integrin alpha5 (AB 1928)	1:500
Anti-Integrin alphav beta3 (MAB 1976)	1:100
Anti-Integrin beta1 (Ab1952-20)	1:500
Anti-Integrin beta3 (MAB 1957)	1:500
Anti-P-Cadherin Antikörper,	1:250
Anti-Phospho-FAK (Tyr 397)	1:1000
Anti-Phospho-Paxillin (Tyr 118)	1:1000
Anti-Phospho-SHC Antikörper (Tyr 317)	1:500
Anti-Plakoglobin Antikörper	1:2000
Anti-pp120 Antikörper	1:1000
Anti-SHC Antikörper	1µg/ml
Anti-β-Actin Antikörper	1:5000
Anti-Tyrosinase Antikörper	1:100
Anti-VASP Antikörper	1:250
Fibronektinfragment 50K,	1µg/ml
Fibronektinfragment H/120	1µg/ml
MAP-Kinase Antikörper	1:1000

Rekombinante alpha4 beta1,	1:100
Rekombinante alpha5 beta1,	1:500

#### 3.3.2.3.7 Silberfärbung im SDS Gel

Die Silberfärbungen der Ko-Immunpräzipitationen wurden mit dem *Silverexpress Silver Staining Kit* der Firma Invitrogen durchgeführt. Der Mechanismus der Silberfärbung beruht auf der Reduktion von Silbernitrat zu metallischem Silber in Proteinen. Die Banden werden dort im Gel sichtbar, wo Silberpartikel ausfallen. Die Reaktion basiert auf chemischer Basis. Durch Ammoniumhydroxid werden Silber-Diaminkomplexe gebildet. Die Banden werden daraufhin durch Ansäuerung mit Zitronensäure sichtbar gemacht. Bei der Silberfärbung wurde das Gel nach Fixierung und Sensitivierung mit einer Mischung aus Silbernitrat, Ammonium- und Natriumhydroxid angefärbt. Entwickelt wurde die Färbung mit Formaldehyd und Zitronensäure und schließlich, nach Abstoppen der Färbereaktion, getrocknet. Dies wurde mit dem Geltrocknungskit von Invitrogen durchgeführt.

#### 3.3.2.3.8 ELISA

Der MIA-ELISA wurde zusammen mit der Firma Roche entwickelt, um die Menge des Proteins MIA in Lösungen zu bestimmen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte über zwei Antikörper: der erste Biotin-konjugierte anti-MIA Antikörper verband MIA mit der Streptavidin-beschichteten Oberfläche. Der zweite Peroxidase-konjugierte Anti-MIA Antikörper band an MIA. Im Vergleich zur parallel durchgeführten Standardreihe konnte die anschließende Farbreaktion Aufschluss über die Menge von MIA in der Probe geben.

Zur Analyse der Bindung von biotinyliertem MIA an die Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 wurden die Integrine in verschiedenen Konzentrationen (alpha4 beta1 1:25- 1:100; alpha5 beta1 1:50- 1:500) auf hochaffinen proteinbindenden 96-Well Platten über Nacht bei 4°C inkubiert (Costar). Die Kontroll- Wells wurden mit jeweils 3% BSA beschichtet. Daraufhin wurden unspezifische Bindungsstellen mit jeweils 200µl Blockpuffer (25 mM Tris/HCL, 150mM NaCl, 5% BSA) 1,5 Stunden lang blockiert. Dann wurden die Wells jeweils mit 200µl Bindungspuffer (150mM NaCl, 25 mM Tris/HCL, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA) drei mal gewaschen. Daraufhin wurden die entsprechenden Wells

mit 1 µg/ml biotinyliertem MIA in 100 µl Bindungspuffer inkubiert. Die Kontrollen wurden jeweils nur mit Bindepuffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte 3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten mit 200 µl Bindungspuffer wurde dann 30 Minuten mit einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidinantikörper (Streptavidin-HRP) inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit jeweils 400 µl Bindungspuffer wurde die Färbereaktion mit jeweils 100 µl ABTS (Roche) durchgeführt. Die 96 Well-Platten wurden nach 1,2,3 und 4 Stunden photometrisch vermessen und ausgewertet (OD bei 405-490 nm). Im analogen Experiment wurden die Platten jeweils mit Fibronektinfragmenten 50K (1-5 µg/ml) und H/120 (1-5 µg/ml) beschichtet.

#### 3.3.2.3.9 MAP-Kinase-Aktivitätsassay

Mit dem MAP-Kinase-Aktivitätsassay wurde die Phosphotransferaseaktivität von MAP-Kinase in Lysaten gemessen. Der Assay basiert auf der Phosphorylierung des spezifischen Substrats MBP (*myelin basic protein*). 40 µg RIPA Lysate der mit biot. MIA inkubierten Zellen wurden mit Mg<sup>2+</sup>/ATP und 20 µg des MAP-Kinase-Substrats MBP in ADBI-Puffer 30 Minuten lang inkubiert. Daraufhin wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das phosphorylierte MBP auf PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur in 3% Trockenmilchpulver mit TBS (TBS-MLK) gegen unspezifische Bindungen des Antikörpers geblockt. Das phosphorylierte Substrat wurde mit einem monoklonalen Anti-Phospho-MBP Antikörper in TBS-MLK, über Nacht, bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit Wasser gewaschen und dann mit Anti-Maus-AP-Zweitantikörper 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur, in TBS-MLK, inkubiert. Danach wurde die Membran noch dreimal mit TBS-0,05% Tween-20 gewaschen. Die Detektion wurde mit dem BCIP/NBT kits (Zymed) durchgeführt.

#### 3.3.2.3.10 Ko-Immunpräzipitation

100 µg RIPA Zelllysate aus verschiedenen Zelllinien wurde in Bindungspuffer (20 mM NaPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst und mit 25 µl Streptavidin gekoppelter G-Sepharose über Nacht bei 4°C vorgereinigt. Nach Zentrifugation (3 Minuten 1600 rpm) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit biotinyliertem MIA (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde eine Stunde mit 50 µl Streptavidin-Sepharose inkubiert.

Daraufhin wurde dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20 µl nicht-reduzierenden Lämmli Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Aufgetrennt wurde die Ko-Immunpräzipitation auf 10-12%tigem Polyakrylamidgel.

#### 3.3.2.3.11 *Immunhistochemie*

Paraffinschnitte von normaler Haut und von Melanomen wurden auf P-Cadherinexpression mittels der ABC Methode untersucht (DAKO-LSAB2-Kit). Die Schnitte wurden durch 1 Stunde bei 72°C im Wärmeschrank von Paraffin befreit. Nach Rehydrierung und Blocken in 5% Ziegeserum/TBST/Tween 0,1% für 1 Stunde, wurde der polyklonale Anti-P-Cadherinantikörper (1:100 BD Bioscience) über Nacht bei 4°C in Ziegeserum inkubiert. Der Zweitantikörper aus dem Kit wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde mittels AEC –Lösung (LSAB2-Kit) sichtbar gemacht. Anschließend wurde mit Hämalaun gegengefärbt.

Um Melanozyten von Keratinozyten zu unterscheiden wurden von normaler Haut Serienschritte angefertigt und gegen Tyrosinase gefärbt. Der dafür verwendete Als Erstantikörper wurde ein monoklonaler Anti-Tyrosinaseantikörper verwendet (1:20 Novocastra).

### 3.3.3 Zellkulturmethoden

#### 3.3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS für 5min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

#### 3.3.3.2 Stabile und transiente Transfektion von Zellkulturzellen

Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Invitrogen: Lipofektamin™). Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein

Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde je nach Resistenzgens des transfizierten Vektors, ausgewählt. Durch das Selektionsmedium konnten nur Zellen, die den gewünschten Vektor aufgenommen hatten überleben.

#### 3.3.3.3 Durchflußzytometrische Analyse von Zellen (FACS)

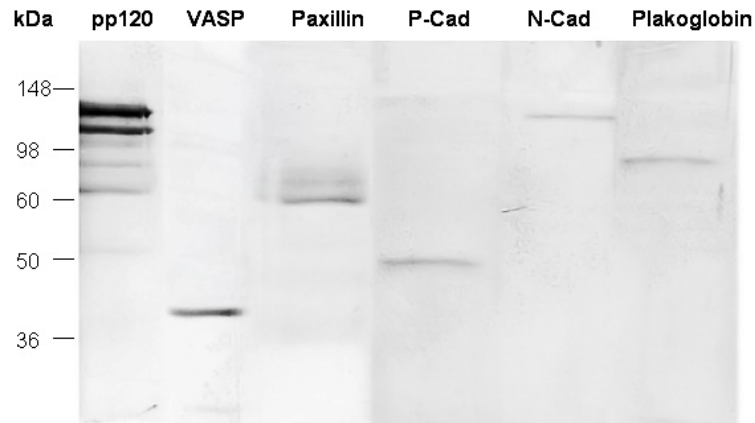
Um die MIA-Bindung an die Zelloberfläche zu analysieren wurden die Zellen mit 5 mM EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in PBS resuspendiert. Es wurden jeweils  $10^6$  Zellen eine Stunde lang mit 0,5 µg/ml biotinyliertem MIA bei 4°C inkubiert. Für die Verdrängungsexperimente wurden jeweils 400 und 800 ng/ml rekombinantes MIA eingesetzt. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper (Streptavidin /Cy5) eine Stunde lang, bei 4°C, inkubiert. Nach zusätzlichen Waschschritten wurde die FACS-Analyse durchgeführt. Um zu Untersuchen, ob MIA die Integrinaktivität der Zellen reguliert, wurden die Zellen, wie oben beschrieben, von der Zellkulturschale abgelöst. 10<sup>7</sup> Zellen wurden in PBS mit 4,5 g/l Glucose resuspendiert und mit, oder ohne biotinyliertem MIA (1 µg/ml), mit Mangan, oder mit EDTA inkubiert. Um die Integrine zu aktivieren wurde 1 mM Mangan verwendet. 1 mM EDTA wurde als Negativkontrolle verwendet. Daraufhin wurden jeweils 50µl der behandelten Zellen mit 50µl des Erstantikörpers 12G10 (20µg/ml, spezifisch für aktivierte Integrine) gemischt und eine Stunde lang bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der aktivierungsunabhängige Antikörper gegen Integrin beta1 (Chemicon) eingesetzt. Nach drei Waschschritten in PBS/1%FKS, wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper Streptavidin/Cy5 in PBS/10% Serum 30 Minuten lang inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Proben fixiert ( in 100µl PBS, 2% Formaldehyd), und anschließend in einem Volumen von 300 µl PBS aufgenommen. Jeweils 20000 Zellen wurden mittels des Facs Calibur (Beckton Dickinson) gezählt und deren Fluoreszenz bei 630 nm gemessen. Die Auswertungen erfolgten mit dem Softwareprogramm *Cellquest* (Beckton Dickinson).

## 4 Ergebnisse

### ***4.1 Untersuchungen an einer verkürzten und sezernierten Form von P-Cadherin in Melanomzellen***

#### **4.1.1 Suche nach Veränderungen bei Zelladhäsionsmolekülen während der Entstehung des malignen Melanoms**

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, Unterschiede bei zelladhäsionsassoziierten Molekülen zwischen Melanozyten und Melanomzelllinien festzustellen. In einem *Western Blot* auf Veränderungen an Zelladhäsionsmolekülen in Melanomzelllinien wurden die Proteine pp120, Paxillin, gamma-Catenin, VASP, N-Cadherin und P-Cadherin untersucht (siehe Abbildung 4-1). Gemäß der Datenbank *Online Mendelian Inheritance in MAN* weisen diese Proteine in den Melanomzelllinien jeweils die erwartete Größe auf. pp120 hat ein Molekulargewicht von 120 kDa. In Abbildung 4-1 erkennt man zusätzliche kleinere Proteinbanden, welche auf Degradationen oder deglykosylierte Formen des Proteins hinweisen. VASP hat ein Molekulargewicht von 40 kDa. Paxillin weist Banden zwischen 65 und 70 kDa auf, wobei das aberrante Laufverhalten des Proteins im Gel wahrscheinlich auf seinen hohen Prolingehalt (10%) zurückzuführen ist (OMIM). N-Cadherin zeigt das bekannte Molekulargewicht von 130 kDa und Plakoglobin von 82 kDa. P-Cadherin jedoch hat ein auffälliges niedriges Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa, wohingegen die erwartete Größe von P-Cadherin 120 kDa beträgt. Aufgrund dieser Besonderheit wurde in dieser Arbeit die kurze, 50 kDa Form von P-Cadherin in Melanomzelllinien genauer untersucht. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dargestellt.



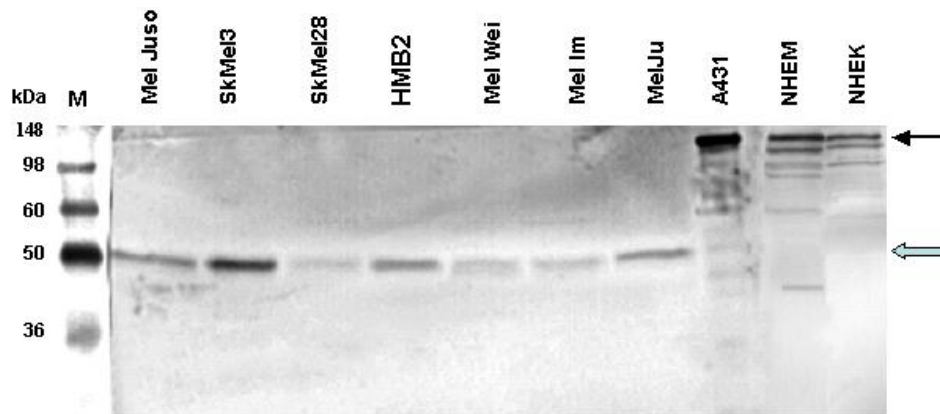
**Abbildung 4-1**

**Analyse verschiedener Zelladhäsionsmoleküle im Zelllysate der Melanomzelllinie Mel Im.** Der Western Blot zeigte eine verkürzte Form von P-Cadherin mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Außerdem erwiesen sich die Molekulargewichte der zelladhäsionsassoziierten Moleküle pp120, VASP, Paxillin, N-Cadherin und Plakoglobin in der Melanomzelllinie als normal.

### 4.1.2 Analyse der P-Cadherinexpression in Melanomzelllinien

Aufgrund der Voruntersuchungen und des auffällig niedrigen Molekulargewichts von P-Cadherin wurden sieben Melanomzelllinien mittels Western Blot-Analyse auf die Expression von P-Cadherin untersucht. Als Kontrollen wurden normale humane Melanozyten (NHEM), normale humane Keratinozyten (NHEK) und eine weitere humane epidermale Keratinozytentumorzelllinie (A-431) verwendet. Alle diese Zelllinien weisen eine hohe P-Cadherinexpression auf. Abbildung 4-2 zeigt in allen Positivkontrollen (A431, NHEM, NHEK) das Protein P-Cadherin bei einer Größe von 120 kDa. In den Melanomzelllinien jedoch wurde ein Protein mit etwa 50 kDa nachgewiesen. In der Western Blot Analyse wurde mit einem Antikörper gefärbt, der spezifisch gegen den extrazellulären, N-terminalen Teil von P-Cadherin gerichtet war. In den nachfolgenden Kapiteln wird diese trunkierte Form von P-Cadherin als P-Cad50 bezeichnet.



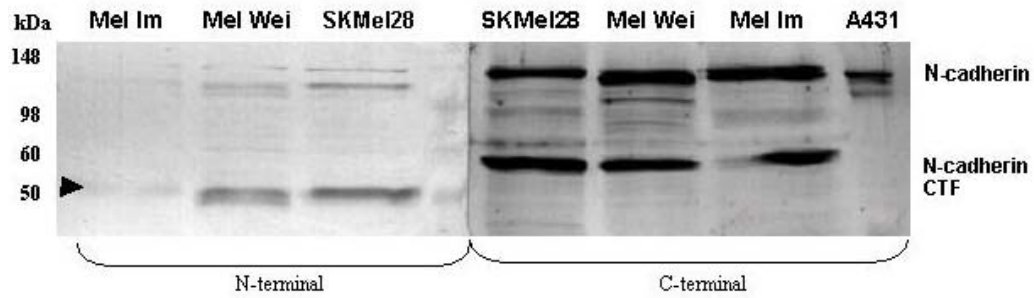


**Abbildung 4-2**

**Western Blot zur Analyse der P-Cadherinexpression in sieben Melanomzelllinien**

Der Blot zeigt ein unerwartet kleines 50 kDa P-Cadherin in den Melanomzelllinien Mel Juso, SK Mel3, Sk Mel28, HMB2, Mel Wie, Mel Im und Mel Ju (P-Cad50; farbiger Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigen die Kontrollzellen A431, NHEM und NHEK die erwartete Größe von P-Cadherin bei ungefähr 120 kDa (schwarzer Pfeil).

Um zu analysieren, ob P-Cad50 auch die C-terminale Domäne beinhaltet, wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen den C-Terminus gerichtet war. Da der C-Terminus bei den klassischen P, E und N-Cadherinen sehr homolog ist, detektierte dieser Antikörper alle drei Cadherine (PEN-Antikörper). Abbildung 4-3 zeigt, dass der Antikörper gegen den N-Terminus bei den Melanomzelllinien Mel Im, Mel Wei und Sk Mel28 ein Protein bei 50 kDa detektiert. Ganz im Gegensatz dazu erkennt der Antikörper gegen den C-Terminus von P-Cadherin kein Protein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Dieses Ergebnis beweist, dass der C-Terminus des Volllänge-P-Cadherins nicht in P-Cad50 enthalten ist. Die Banden, welche mit dem Antikörper gegen den C-Terminus von P-Cadherin detektiert wurden, zeigen N-Cadherin. Da dieses Protein in vielen Zellen proteolytisch gespalten wird, handelt es sich bei dem kleineren 60 kDa Fragment um das C-terminale Fragment von N-Cadherin (N-Cadherin CTF) (Rattner et al., 2004; Paradies et al., 1993).



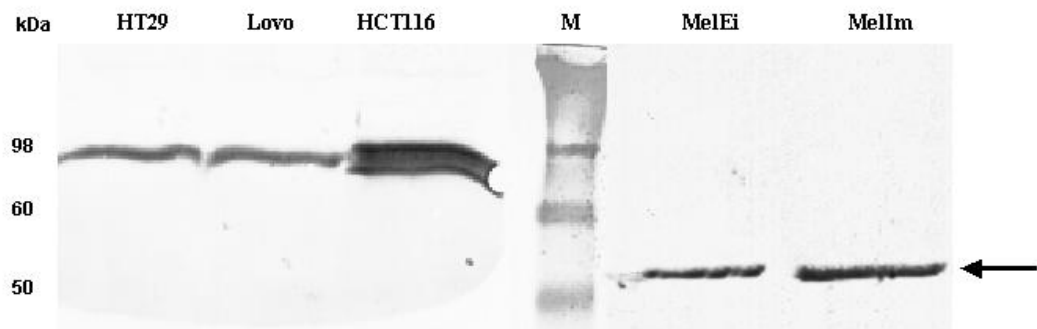
**Abbildung 4-3**

**Detektion der N- und C-terminalen Region von P-Cadherin in Melanomzellen mittels Western Blot-Analyse.**

RIPA-Zelllysate von Mel Im, Mel Wei und Sk Mel28 wurden mit spezifischen Antikörpern gegen den N- oder C-terminalen Teil von P-Cadherin untersucht. Der gegen den N-Terminus gerichtete Antikörper detektierte eine Größe bei 50 kDa, während der, gegen den C-terminalen Teil gerichtete Antikörper auf gleicher Höhe kein Protein detektierte. P-Cad50 wird nicht durch den C-terminalen Antikörper erkannt. CTF= C-terminales Fragment; A431= Positivkontrolle, Keratinozytenzelllinie.

### 4.1.3 Sezernierung der verkürzten Form von P-Cadherin

Der C-terminale Bereich der Cadherine beinhaltet sowohl die zytoplasmatische, als auch die Transmembrandomäne. Da der C-Terminus bei der 50 kDa Form von P-Cadherin fehlt, wurde untersucht, ob diese verkürzte Variante sezerniert wird. Daher wurden die Überstände der Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei mittels Western Blot-Analyse untersucht. Abbildung 4-4 zeigt die 50 kDa Form in den Überständen der Melanomzellen, dieses bedeutet, dass das Protein sezerniert wird. Die Überstände von Kolonkarzinomzelllinien dagegen zeigten keine sezernierte 50 kDa große Variante von P-Cadherin. Das 98 kDa Fragment stellt höchstwahrscheinlich proteolytisch geschnittenes P-Cadherin dar (Rattner et al., 2004; Paradies et al., 1993).

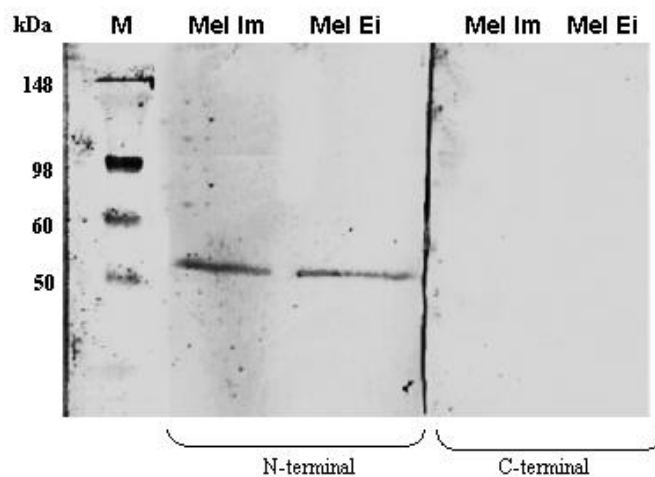


**Abbildung 4-4**

**Analyse von P-Cadherin in Zellkulturüberständen.**

Die Abbildung zeigt einen Western Blot. Die Zellkulturüberstände der Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei und den Kolonkarzinomzelllinien HT29, Lovo und HCT116 wurden auf sezerniertes P-Cadherin untersucht. Im Gegensatz zu den Überständen der Kolonkarzinomzelllinien wurde in den Melanomzelllinien die 50 kDa Bande detektiert. M= Größenstandard.

Abbildung 4-5 zeigt die Überstände von Mel Ei und Mel Im, die auf den C-, beziehungsweise N-Terminus von P-Cadherin untersucht wurden. Auch hier zeigte sich, dass in den Überständen nur der gegen den N-Terminus gerichtete Antikörper ein 50 kDa Protein detektierte. Der Antikörper, der spezifisch gegen den C-Terminus gerichtet war, zeigte in den Zelllysatsüberständen kein Signal.



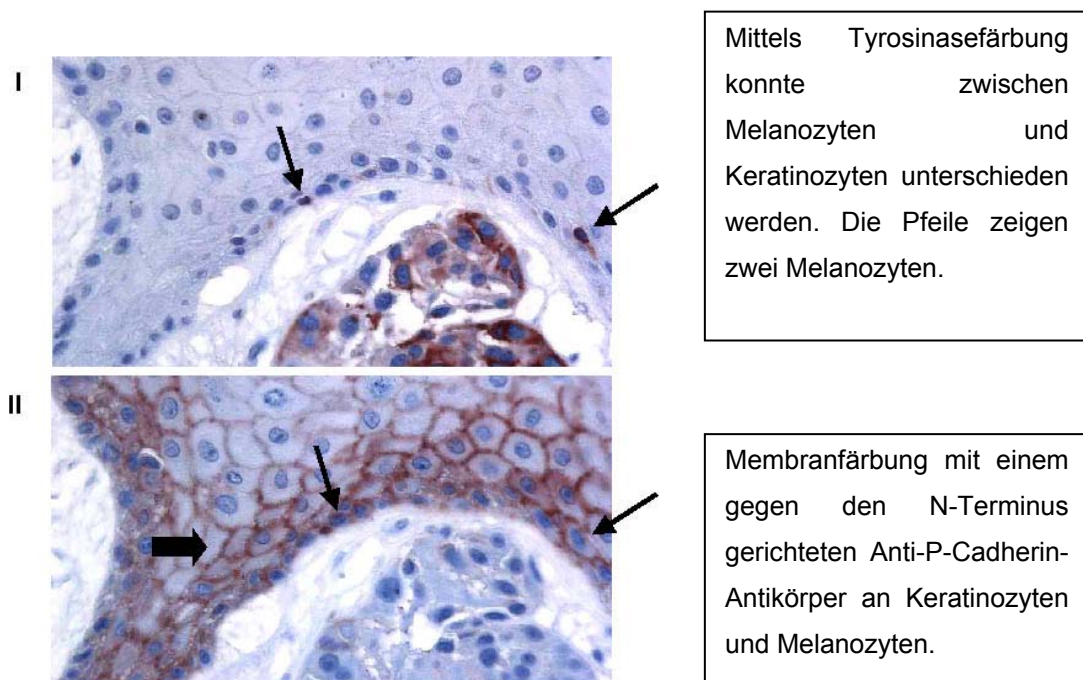
**Abbildung 4-5**

**Analyse der Zellkulturüberstände der Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei.**

Die Abbildung zeigt einen Western Blot mit Antikörper gegen die C-terminale- beziehungsweise N-terminale Domäne von P-Cadherin. Der Antikörper, der gegen den N-Terminus gerichtet war detektierte die 50 kDa Variante von P-Cadherin, wohingegen der Antikörper gegen den C-Terminus kein Signal zeigte.

### 4.1.4 Analyse der *in situ* Expression der 50 kDa Form von P-Cadherin

Um zu bestätigen, dass es im malignen Melanom zur Sezernierung von P-Cadherin kam, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Schnitten von humaner Haut durchgeführt (siehe Abbildung 4-6 ). Um Melanozyten von Keratinozyten zu unterscheiden, wurden gegen Tyrosinase gerichtete Antikörper eingesetzt. Die Abbildung 4-6 I und II zeigen denselben Ausschnitt einer Epidermis. Abbildung I zeigt zwei gegen Tyrosinase gefärbte Melanozyten (Pfeile), wobei der untere angefärbte Teil der Abbildung Melanomgewebe zeigt. Abbildung II illustriert die Färbung mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von P-Cadherin. Sowohl in Keratinozyten (dicker Pfeil in Abbildung II), als auch in Melanozyten wurde hierbei membranständiges P-Cadherin angefärbt.

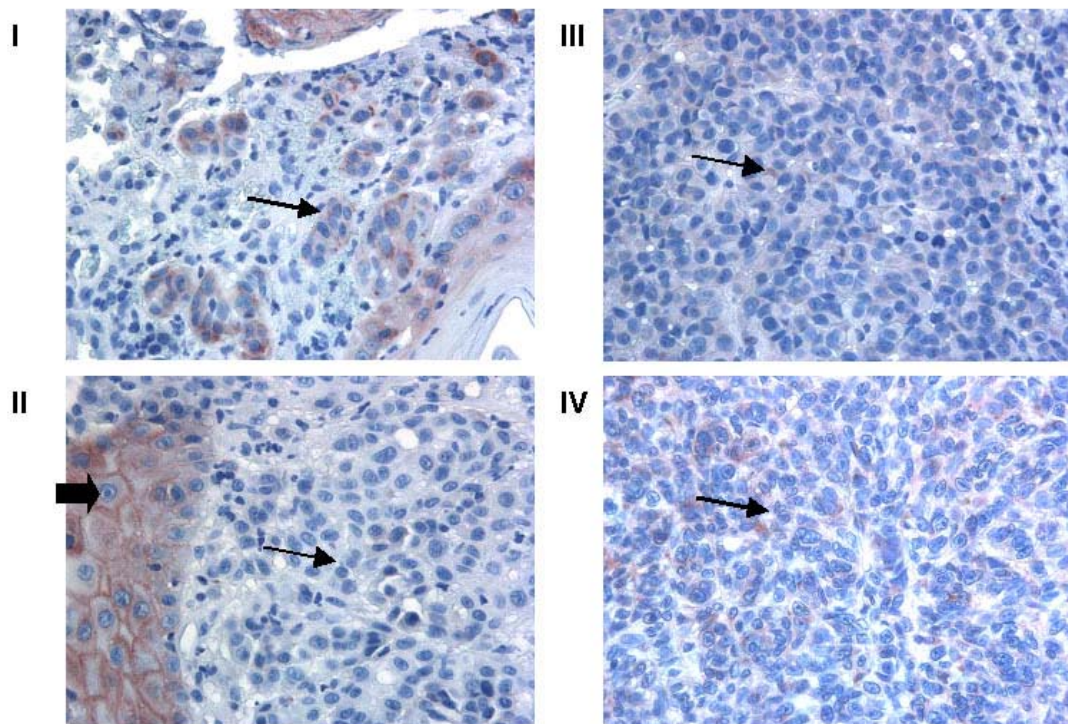


**Abbildung 4-6**

**Immunhistochemische Analyse der Expression von P-Cadherin in normaler humaner Haut.**

Die Färbung wurde mit einem Antikörper, der spezifisch gegen P-Cadherin gerichtet war, durchgeführt. In Abbildung I) erkennt man die für Melanozyten spezifische Tyrosinasefärbung. Abbildung II) zeigt die membranständige Färbung von P-Cadherin sowohl in Melanozyten (dünne Pfeile), als auch in Keratinozyten (dicker Pfeil).

Abbildung 4-7 zeigt im Gegensatz dazu einen Verlust der membranständigen Färbung, aber eine schwache zytoplasmatische Färbung an primären (I, II) und metastasierten (III, IV) Melanomen (dünne Pfeile). Die Abbildung I zeigt die zytoplasmatische Färbung von P-Cadherin in Melanomnestern (Pfeil). In Abbildung II erkennt man auf der linken Seite noch gesundes Gewebe mit Keratinozyten (dicker Pfeil), die eine starke membranständige P-Cadherinfärbung aufweisen.



**Abbildung 4-7**

**Expressionsmuster von P-Cadherin in primären (I und II) und metastasierten (III und IV) Melanomen.**

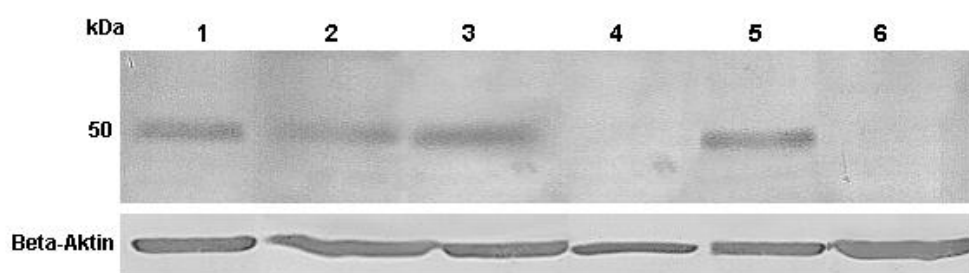
Im Vergleich zur membranständigen Lokalisation in Melanozyten in der Epidermis, findet man P-Cadherin in Tumorzellen im Zytoplasma (dünne Pfeile). In normalen Keratinozyten ist eine membranständige Färbung sichtbar (dicker Pfeil in Abbildung II)).

### **4.1.4.1 Analyse der P-Cadherinexpression in tissue microarrays (TMA)**

In einem TMA wurde in 318 Gewebeporben die Intensität (1+ bis 2+) der P-Cadherinexpression in der Membran und im Zytoplasma detektiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die P-Cadherinexpression malignen Melanom ( $p<0,001$ ) und in Melanommetastasen ( $p<0,001$ ) signifikant reduziert war, im Vergleich zu gutartigen Nävi. Zusätzlich konnte ein Verlust von membranständigem P-Cadherin mit zunehmendem Clark Level ( $p=0,011$ ) und zunehmender Tumordicke ( $p<0,001$ ) korreliert werden. Auch der Vergleich von Nävi-Subtypen zeigte eine signifikant verminderte P-Cadherinexpression in dermalen Nävi, im Vergleich zu *compound* und *junctionalen* Nävi.

### **4.1.5 Western Blot Analyse von P-Cadherin in Melanommetastasen**

Eine weitere Bestätigung, dass das trunkierte P-Cad50 nicht nur in Melanomzelllinien, sondern auch im Melanomgewebe *in situ* vorkommt, ergab die Western Blot-Analyse von Proteinlysaten aus Melanommetastasen verschiedener Patienten. Der Western Blot in Abbildung 4-8 zeigt Zelllysate aus Melanommetastasen von Gehirn, Haut und Lunge. Als Negativkontrolle dienten die Zelllysate eines hepatozellulären Karzinoms und des normalen Hautgewebes. Im Gegensatz zu normaler Haut zeigte sich in allen Metastasen des Melanoms die 50 kDa Form von P-Cadherin.



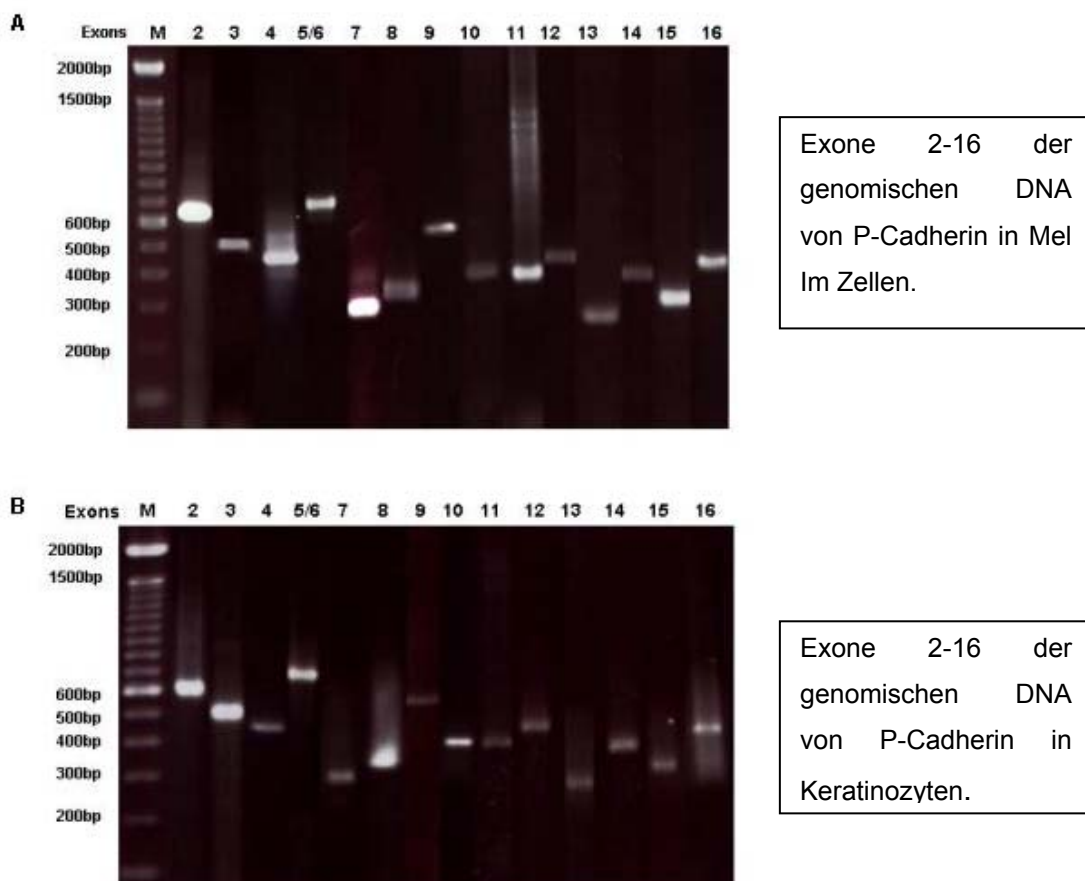
**Abbildung 4-8**

**Analyse der Expression von P-Cadherin in Metastasen verschiedener Melanompatienten.** Die Abbildung zeigt einen Western Blot. Die spezifische P-Cadherin Färbung zeigt ein Molekulargewicht von 50 kDa in Metastasen von Melanompatienten. 1= Melanommetastase im Gehirn, 2= Melanommetastase in der Haut, 3= Melanommetastase in der Lunge, 4= hepatozelluläres Karzinom (Negativkontrolle), 5= Die Melanomzelllinie Mel Im, 6= normales Hautgewebe.



### 4.1.6 Analyse der genomischen P-Cadherinsequenz in Melanomzelllinien

Ein Grund für eine Verkürzung von P-Cadherin könnten Mutationen sein, die auf genomischer Ebene auftreten. Daher wurde untersucht, ob die genomische DNA aus Melanomzellen Deletionen, Punktmutationen oder aberrante Veränderungen an den Exon-Introngrenzen aufwies. Abbildung 4-10 A zeigt eine schematische Übersicht über die genomische Struktur des Gens von P-Cadherin (cdh3). Die Exone 2 bis 16 des P-Cadheringens wurden aus genomischer DNA der Melanomzelllinie Mel Im amplifiziert und anschließend sequenziert. Als Kontrolle wurden primäre Keratinozyten verwendet. Abbildung 4-9 A zeigt, dass keines der PCR Produkte der Melanomzelllinie Mel Im genomische Deletionen aufwies. Auch die Sequenzierungen zeigten weder in den Exonen noch an den Exon-Intron Grenzen Mutationen.



**Abbildung 4-9**

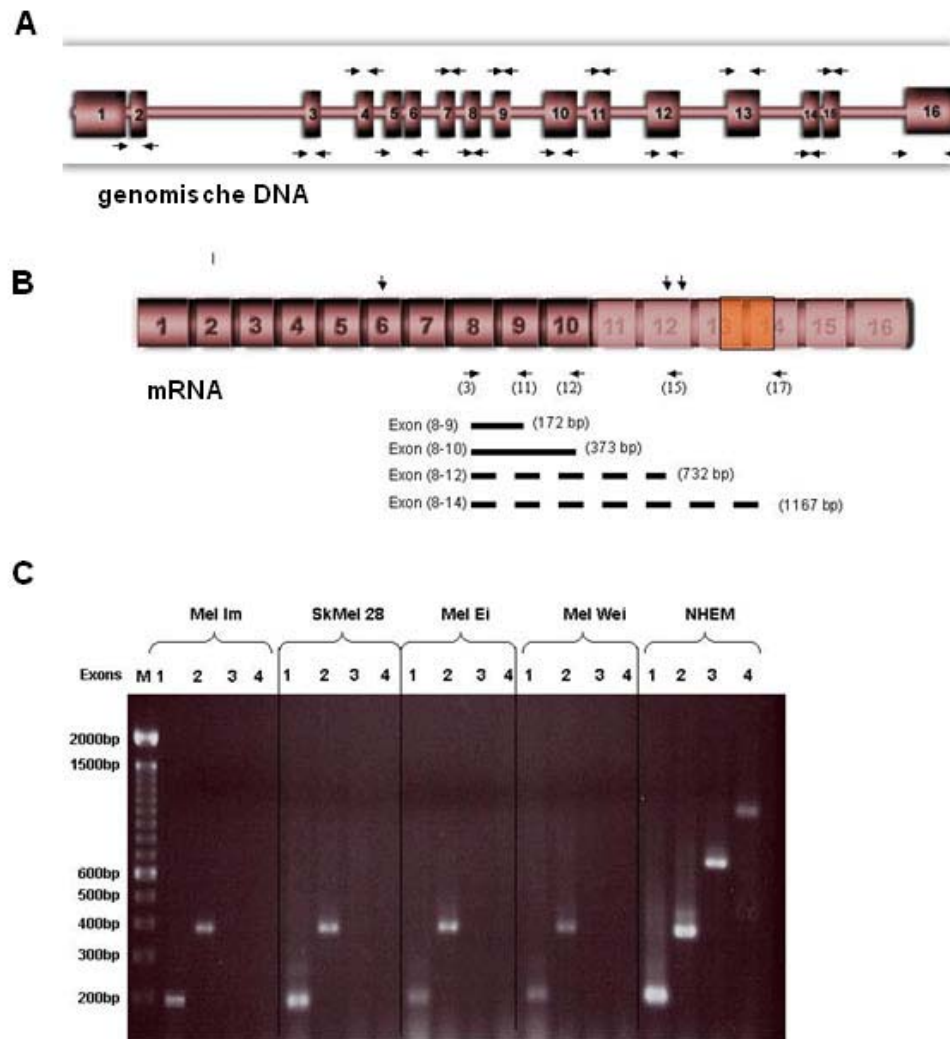
**PCR Amplifikation der Exone 2 bis 16 des P-Cadheringens aus genomischer DNA von Mel Im Zellen und Keratinozyten.**

Alle Exone wurden sowohl in Mel Im Zellen (A), als auch in epidermalen Keratinozyten (B) erfolgreich amplifiziert. Die anschließende Sequenzierung der Produkte wies keine Mutationen der genomischen P-Cadherinsequenz in Melanomen auf (M= Größenstandard).

### 4.1.7 Analyse der P-Cadherin mRNA in Melanomzelllinien

Da keine Deletionen oder Mutationen auf genomischer Ebene entdeckt wurden, wurde untersucht, ob in den Melanomzelllinien eine veränderte Spleißvariante der P-Cadherin mRNA vorlag. Die mRNA besteht aus insgesamt 3650 Basen (siehe schematisches Diagramm der P-Cadherin mRNA in Abbildung 4-10 B). Ein 5' Primer in der kodierenden Region für Exon 8 (947) wurde mit 3' Primern der kodierenden Regionen für die Exone 9 (1119), 10 (1320), 12 (1679) und 14 (2114) kombiniert. In den normalen Melanozyten (NHEM) konnten erwartungsgemäß alle Fragmente amplifiziert werden. In jeder der vier untersuchten Melanomzelllinien Mel Im, SK Mel 28, Mel Ei und Mel Wei, waren aber nur die kodierenden Regionen der Exone 9 und 10 detektierbar. Die den Exonen 12 und 14 entsprechenden Bereiche der P-Cadherin mRNA konnten jedoch nicht amplifiziert werden (siehe Abbildung 4-10 C). Weiterhin waren keine Amplifikationsprodukte der mRNA der Melanomzellen sichtbar, nachdem Primer in den Exonen 11, 15, 16 entsprechenden Bereichen und der 3'UTR (untranslatierten Region) gesetzt wurden. Es wurden weder die erwarteten, noch eventuell kürzere Stücke gefunden, die einen Hinweis darauf geben würden, dass der 3'Bereich der mRNA in Melanomzelllinien fehlt.





**Abbildung 4-10**

#### Schematische Struktur und Analyse definierter Regionen der mRNA von P-Cadherin

**A)** Schematischer Überblick über die Exon-Intron Struktur des *cdh3* Gens. Die Exone sind von 1-16 durchnummeriert. **B)** Schematischer Überblick über die mRNA von P-Cadherin. Das halbdurchsichtige Quadrat stellt die Transmembrandomäne dar. Die vertikalen Pfeile zeigen mögliche Glykosylierungsstellen an (Shimoyama et al., 1998). Die horizontalen Pfeile und Nummern in Klammern markieren jeweils die 3' und 5' Enden der Primer, die benutzt wurden, um die P-Cadherin mRNA zu amplifizieren (siehe auch Abbildung C und Material und Methoden 3.1.5). Die durchgezogenen Linien zeigen amplifizierte RT-PCR Produkte an. Die gestrichelten Linien zeigen Produkte an, die in Melanozyten (NHEM), aber nicht in Melanomzellen detektiert wurden (siehe auch Abbildung C). Der helle Teil des Schemas zeigt demnach den fehlenden Teil der P-Cadherin mRNA. **C)** Amplifikation definierter Regionen der P-Cadherin mRNA. Die Amplifikation der Exone 8-12 und 8-14 zeigte in den Melanomzelllinien Mel Im, SK Mel28, Mel Ei und Mel Wei keine PCR Produkte (siehe Banden 3 und 4). Im Gegensatz dazu wurden die PCR Produkte der Exone 8-12 und 8-14 in Melanozyten (NHEM) sichtbar (Bande 1: 947-1119 = Exon 8-10; Bande 2: 947-1320 = Exon 8-10; Bande 3: 947-1679 = Exon 8-12; Bande 4: 947-2114 = Exon 8-14; M=Größenstandard).

Wie die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, ist P-Cadherin in Melanomzellen trunkiert und wird sezerniert. Die Sezernierung des Proteins könnte die Inhibition der homophilen Interaktionen zwischen P-Cadherinmolekülen auf der

Zelloberfläche benachbarter Zellen mit denen der transformierenden Zelle bewirken. Auf diese Weise verliert eine maligne Zelle langsam die Kontakte zu anderen Zellen in der Umgebung. Eines oder mehrere solcher Ereignisse ermöglichen transformierten Zellen letztendlich die Migration und Invasion in andere Gewebe.

### **4.2 Charakterisierung von spezifischen Bindungspartnern des Proteins MIA**

MIA (*melanoma inhibitory activity*) ist ein Protein von dem auch bekannt ist, dass es Melanomzellen ermöglicht, sich durch Inhibition von Zellkontakten zur extrazellulären Matrix von ihrer Unterlage zu lösen. In nachfolgenden Kapiteln wurde analysiert, ob MIA, neben der Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix, noch weitere Bindungen zu Proteinen auf der Zelloberfläche von Melanomzellen eingehen kann. Außerdem wurde untersucht, ob durch MIA Signalwege in der Zelle beeinflusst werden.

#### **4.2.1 Expression von rekombinantem biotinyliertem MIA**

Proteine mit Biotin zu markieren ist eine allgemein angewandte Methode zur streptavidinabhängigen Detektion, Reinigung und Immobilisierung. Um die Detektion von MIA in den folgenden Versuchen einfacher zu gestalten, wurde das Protein mit Biotin gekoppelt. Zunächst wurde die cDNA von MIA in den Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Die Sequenz beinhaltet einen Abschnitt, der für eine Biotinbindestelle kodiert (*Avi-Tag*), sowie eine Schnittstelle für die Serinprotease Faktor Xa. Um zu verhindern, dass MIA sezerniert wird, wurde die dafür verantwortliche Signalsequenz bei der Klonierung nicht eingeschlossen. Die 5'Primer wurden mit einer *NdeI*-Restriktionsschnittstelle, einer *Avi-Tag*-Sequenz und einer FXa-Schnittstelle (25, Kapitel 3.1.5) hergestellt. Die 3'Primer enthielten ein Stop-Kodon und eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle (26, Kapitel 3.1.5).

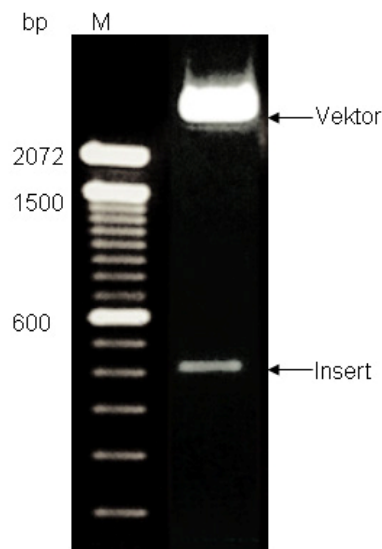


**Abbildung 4-11**

**Schematische Darstellung des amplifizierten Produktes der MIA cDNA mit Avi-Tag in den Vektor pIVEX2.3-MCS.**

Das zu klonierende Produkt hat eine Länge von 410 bp. Es enthält keine Signalsequenz, jedoch NdeI und BamHI Restriktionsschnittstellen, einen Avi-Tag und Faktor X Schnittstelle am 5'-Bereich. Zusätzlich ein Stopcodon am 3'-Ende des Produktes.

In einer PCR-Reaktion wurde der mit *Avi-Tag* fusionierte, kodierende Teil der MIA-cDNA ohne Signalsequenz amplifiziert. (siehe Abbildung 4-11). Das Produkt wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert (siehe Abbildung 4-12).



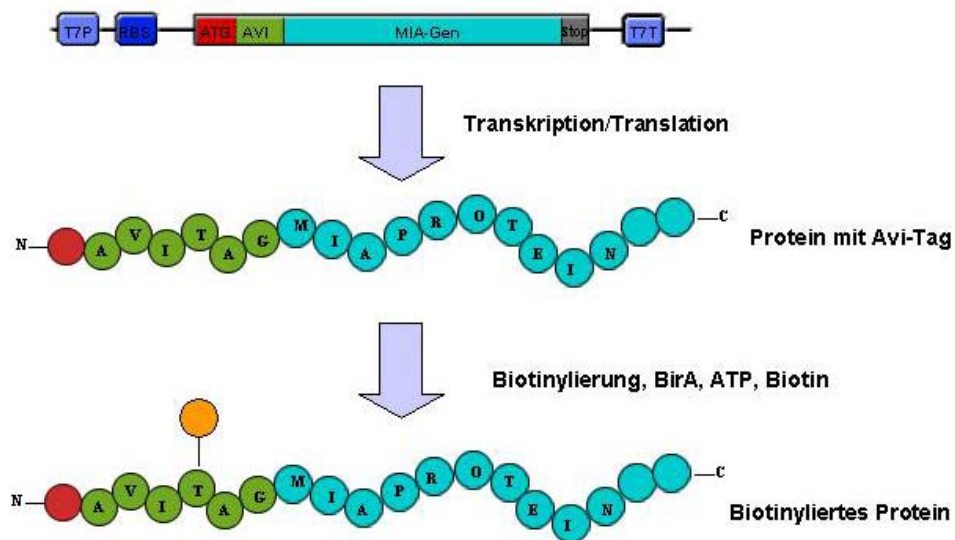
**Abbildung 4-12**

**Agarosegelbild der Klonierung von MIA in den Vektor pIVEX2.3-MCS (Roche).** In die NdeI/BamHI Schnittstelle wurde der kodierende Bereich der MIA-cDNA mit einer Größe von 410 bp kloniert.

Dieses Expressionsplasmid wurde dann im *Rapid Translation System (RTS, Roche)* eingesetzt. Dies ist ein zellfreies, auf *E.coli* basierendes, *in vitro* Protein

Transkriptions-/Translationssystem. Mit Hilfe des RTS Systems war es möglich, ausreichend große Proteinmengen von bis zu 6 µg/µl für funktionelle Assays, Charakterisierungsstudien oder strukturelle Analysen herzustellen. Die Konzentration konnte mit Hilfe eines bereits etablierten MIA-ELISA-Systems ermittelt werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe des ELISA-Systems bestätigt, dass biot. MIA in der richtigen Konformation vorliegt. Ein funktioneller *in vitro* Assay mit Hilfe der Boydenkammer zeigte, dass das im RTS-System hergestellte biotinylierte MIA die Invasivität von Melanomzellen *in vitro* hemmt. Dies entspricht den bereits bekannten Daten, die mit rekombinanten MIA gewonnen wurden.

Das entstehende Protein enthielt die Peptidsequenz MSGLNDIFEAQKIEWHE am N-Terminus (Avidity LLC, Denver, USA). Durch Zugabe der *E. coli* Biotinligase BirA und Biotin zum Reaktionsansatz, konnte die Kopplung einzelner Biotinmoleküle an die ε-Aminogruppe der Aminosäure Lysin (K) stattfinden. Abbildung 4-13 zeigt das Prinzip der Herstellung des biotinylierten MIAs mittels des RTS-Systems.

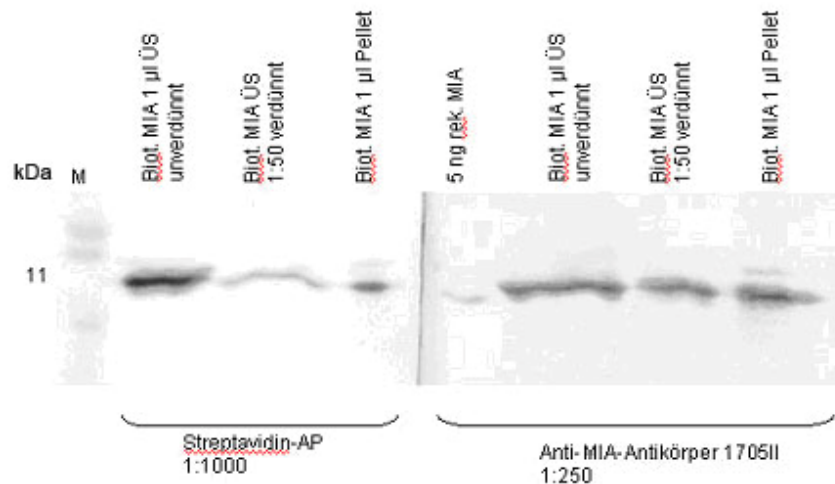


**Abbildung 4-13**

**Prinzip der Biotinylierung von MIA im RTS System.**

Die MIA-cDNA wurde mittels geeigneter Primer (Primer 25,26 in Kapitel 3.1.5) in einer PCR-Reaktion mit einer kodierenden Avi-DNA-Sequenz kombiniert. Nach Transkription und Translation im RTS-System (Roche) enthielt das entstandene Protein eine N-Terminale Avi-Peptidsequenz, die mit Hilfe der Biotinligase BirA an einer definierten Stelle biotinyliert werden konnte. T7P: T7 Promotor, RBS: ribosomale Bindestelle, T7T: T7 Terminator.

Abbildung 4-14 zeigt einen Western Blot von biotinyliertem MIA, das im RTS-System in 24 Stunden bei 25 °C hergestellt wurde. Das biotinylierte Protein ließ sich sowohl mit Streptavidin als auch mit dem Anti-MIA-Antikörper 1705II detektieren. Da bekannt ist, dass ein großer Anteil an ausgefallenem Protein im Pellet nicht in der richtigen Konformation vorliegt, wurde für weitere Experimente nur der Überstand der RTS-Reaktion, der bei 10 000 UpM abzentrifugiert wurde, verwendet.



**Abbildung 4-14**

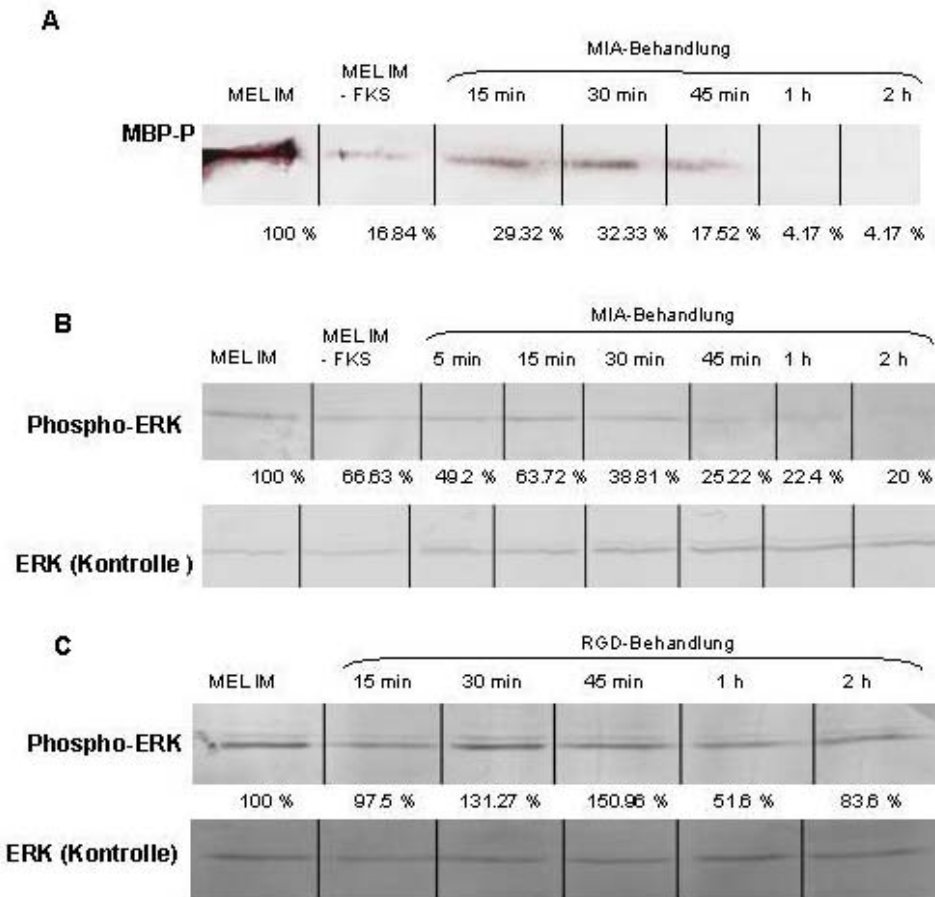
**Western Blot zum Nachweis von biotinyliertem MIA.**

Detektiert wurde jeweils mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Streptavidin-Antikörper (Streptavidin-AP) und dem bereits etablierten MIA Antikörper 1705II. Alle Banden zeigen das Protein auf einer Größe von 11 kDa. Die Abbildung zeigt biotinyliertes MIA sowohl im Pellet, als auch im Überstand. Die Konzentration des Proteins wurde im ELISA ermittelt. Rek. MIA = nicht-biotinyliertes, rekombinantes MIA, biot. MIA = im RTS System (Roche) biotinyliertes MIA, ÜS = Überstand.

### 4.2.2 MIA reduziert die MAP-Kinase Aktivität im malignen Melanom

Es ist bekannt, dass MIA durch spezifische Bindung an Makromoleküle der extrazellulären Matrix deren Bindung an Integrine beeinflusst. Integrine wiederum übertragen Signale via MAP-Kinasen (siehe Einleitung 2.5.1) Aus diesem Grund wurde überprüft, ob MIA einen Einfluss auf die MAP-Kinaseaktivität von Melanomzellen zeigt. Hierbei wurden Mel Im Zellen über definierten Zeitintervallen mit rekombinantem MIA (rek. MIA) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert, und die Phosphorylierung des MAP-Kinase Substrats *myelin basic protein* (MBP) mittels eines Western Blots nachgewiesen. Abbildung 4-15 A zeigt eine Verringerung der MBP

Phosphorylierung und damit eine Verminderung der Aktivität der MAP-Kinasen um ungefähr 96% nach zwei Stunden Inkubation mit rekombinantem MIA. Um zu ermitteln, welche der bekannten MAP-Kinasen nach MIA Inkubation eine Verminderung ihrer Aktivität aufwiesen, wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der bekanntesten MAP-Kinasen, p38, JNK und ERK1/2, im Western Blot eingesetzt. Nach Inkubation der Melanomzellen mit rekombinantem MIA und anschließendem Western Blot der Zelllysate wurde keine Veränderung der Phosphorylierung von p38 und JNK und damit keine veränderte Aktivität festgestellt (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte die MAP-Kinase ERK 1/2 jedoch eine reduzierte Phosphorylierung bereits nach 45 Minuten MIA-Inkubation (siehe Abbildung 4-15 B). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Proteinbanden wurde jeweils die Gesamtproteinmenge von ERK1/2 detektiert. Die Quantifizierung des Western Blots in Abbildung 4-15 B zeigt einen Rückgang der ERK1/2 Phosphorylierung und damit eine Verringerung der Aktivität um 80 % nach zwei Stunden MIA-Inkubation. Um zu testen, ob die Aktivitätsminderung von ERK 1/2 nicht daran lag, dass MIA bekanntermaßen durch Bindung an Fibronectin die Ablösung der Zellen vom Substrat bewirkt, wurden die Melanomzellen mit RGD-Peptid inkubiert. Die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) von Matrixproteinen ist eine wichtige Bindungsstelle für Integrine an die extrazelluläre Matrix (siehe Einleitung 2.6.1). Nach Inkubation der Melanomzellen mit RGD-Peptid zeigte ERK 1/2 nur eine geringe Veränderung der Phosphorylierung und damit der Aktivität (siehe Abbildung 4-15 C). Dies deutet darauf hin, dass MIA die ERK-Aktivität mittels einer anderen Bindungsstelle beziehungsweise eines anderen Mechanismus, als der RGD-Bindungsstelle, beeinflusst.



**Abbildung 4-15**

### Analyse des Einflusses von MIA auf die MAP-Kinase ERK 1/2 mittels Western Blot.

**A** Mit MIA vorbehandelte Zelllysate wurden mit MBP Substrat inkubiert. Das phosphorylierte MBP wurde mittels Western Blot sichtbar gemacht. In Melanomzellen wurde eine Verringerung der Phosphorylierung von MBP und damit eine Absenkung der MAP-Kinase Aktivität nach MIA-Behandlung beobachtet. **B** Die Western Blot-Analyse zeigte eine stetige Verringerung der ERK-Phosphorylierung in Melanomzellen nach MIA-Behandlung mit einem Maximum bei 45 Minuten bis 2 Stunden. **C** Inkubation von Melanomzellen mit RGD Peptiden bewirkte keine Änderung in der ERK-Phosphorylierung; dies bedeutet, dass MIA auf spezifischem Weg die Aktivität der ERK-Kinase senkt.

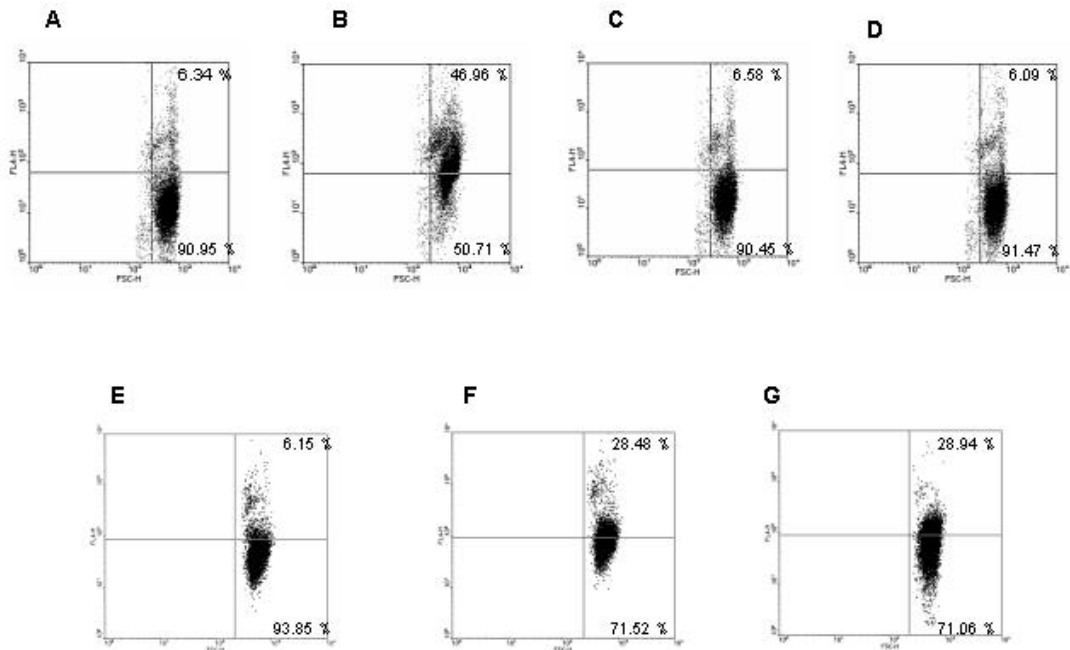
### 4.2.3 MIA bindet an die Zelloberfläche

Weil MIA die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK 1/2 beeinflusst, wurde weiterhin analysiert ob MIA mit spezifischen Oberflächenrezeptoren der Melanomzellen interagieren kann und so in der Lage ist die mitogenen Signalwege in der Zelle zu modulieren. Um die Bindung von MIA an die Zelloberfläche der Melanomzellen zu detektieren, wurden durchflußzytometrische Analysen (FACS) durchgeführt. Hierbei wurde ein mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 gekoppelter Streptavidinantikörper verwendet. Abbildung 4-16 B zeigt vergleichend zu Abbildung 4-16 A einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität der Melanomzellen nach

Inkubation mit biotinyliertem MIA. Die prozentualen Auswertungen der Daten in Abbildung 4-16 A-G wurden mit dem FACS-Analyseprogramm WinMDI 2.8 erstellt. Der Quadrant rechts oben weist hierbei einen Anstieg der fluoreszierenden Zellen um 40,6 % auf. Dieses Ergebnis weist auf eine Bindung von MIA an die Zelloberfläche hin. Die Spezifität der Bindung wurde durch Kompetition mit 400 ng/ml und 800 ng/ml unmarkierten MIAs bestätigt (siehe Abbildung 4-16 C und Abbildung 4-16 D).

In früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass MIA an Fibronectin binden kann. Um auszuschließen, dass die beobachtete Bindung an die Zelloberfläche von MIA lediglich ein Resultat der Bindung an Fibronectin ist, wurden im Experiment embryonale Mausfibroblasten (MEFs, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Reinhard Fässler) verwendet. Dabei wurden Fibronectin exprimierende MEFs aus Wildtyp-Mäusen und Fibronectin defiziente Zellen aus Knock-out-Mäusen verwendet. Die Abbildung 4-16 F/G zeigen, dass es keinen Unterschied der MIA-Bindung an die Zelloberflächen von Fibronectin-positiven (Abbildung 4-16 F, FN +/+) oder Fibronectin-negativen (Abbildung 4-16 G, FN -/-) Zellen gibt. Dies beweist, dass Fibronectin nicht für die in Abbildung 4-16 A/B beobachtete Bindung von MIA an die Zelloberfläche verantwortlich ist.





**Abbildung 4-16**

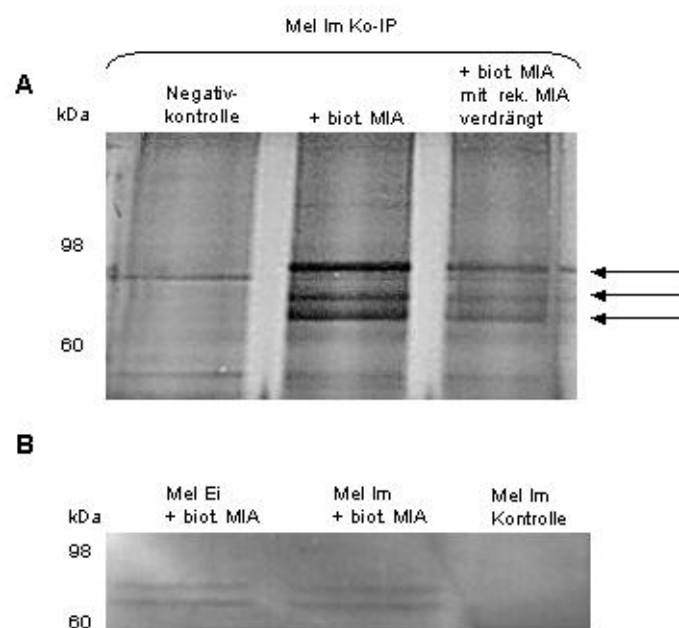
### **Durchflußzytometrische Untersuchung der Bindung von MIA an die Oberfläche von Melanomzellen**

**A** Mel Im Zellen wurden mit Streptavidin/Cy5 inkubiert. **B** Mel Im Zellen, die mit biotinyliertem MIA (0,5µg/ml) und Streptavidin/Cy5 inkubiert wurden, wiesen auf ihrer Oberfläche eine Bindung von MIA auf. **C/D** Die Verdrängung von biotinyliertem MIA durch rekombinantes MIA (400 ng/ml und 800 ng/ml) zeigte, dass die Bindung von MIA an die Oberfläche von Mel Im Zellen spezifisch ist. **E/F/G** Die Bindung von MIA an FN positive (**F**) und Fn negative (**G**) Mausfibroblasten (FN= Fibronektin). **E** Mausfibroblasten ohne biotinyliertes MIA wurden als Negativkontrolle verwendet.

### **4.2.4 Identifikation von MIA- Bindungspartnern**

Durch Ko-Immunpräzipitation (siehe Abbildung 4-17 A) und Far-Western Blots (siehe Abbildung 4-17 B) wurden die Zelllysate von Melanomzellen nach MIA-Bindungspartnern untersucht. Die Abbildung 4-17 A und B zeigen, dass MIA an Proteine der Zelllysate von Melanomzellen binden kann. Die Abbildungen stellen dar, dass mit beiden Untersuchungsmethoden Interaktionspartner von MIA ein Molekulargewicht von 70, 80 und 100 kDa aufwiesen. Der Unterschied zwischen beiden Methoden liegt darin, dass MIA bei der Ko-Immunpräzipitation an native Proteine bindet, wohingegen im Far-Western Blot Proteine im denaturierten Zustand detektiert werden. Auf die gezeigten Banden wurde in dieser Arbeit deshalb fokussiert, da sie in beiden Assays sichtbar sind und da sie im Far-Western nach Denaturierung und anschließender Renaturierung der

Proteine auf der PVDF Membran mittels biotinyliertem MIA detektiert wurden. Dies ist in beiden Untersuchungsmethoden die Bestätigung dafür, dass MIA mit Proteinen nativer Konformation im Zelllysate von Melanomzelllinien interagieren kann. Dass die Bindung spezifisch ist, ließ sich dadurch zeigen, dass die Interaktionspartner mit nicht-biotinyliertem rekombinantem MIA (1µg/ml rek MIA) verdrängt werden konnten (siehe Abbildung 4-17 B). Es ist zu erwähnen, dass bei den Ko-Immunpräzipitationen noch weitere, kleinere Banden sichtbar wurden. Diese sind hier nicht gezeigt und müssen in zukünftigen Untersuchungen weiter charakterisiert werden.



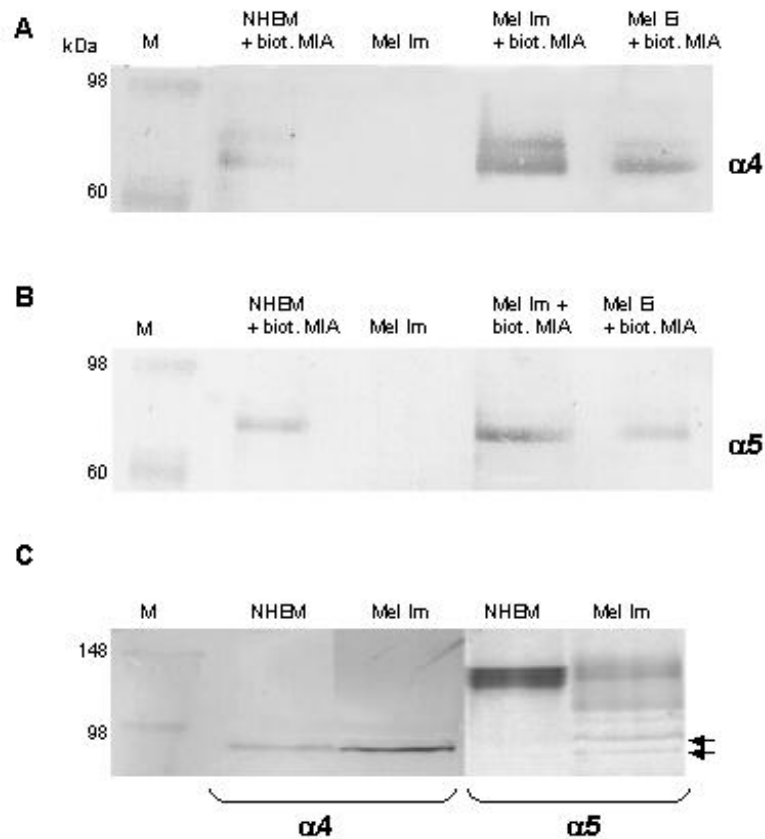
**Abbildung 4-17**

### **Die Bindung von biotinyliertem MIA an Proteine in Zelllysaten von Melanomzelllinien**

**A** Ko-Immunpräzipitation von 200 ng/µl biotinyliertem MIA mit jeweils 50 µg Gesamtprotein der Melanomzelllinie Mel Im. Anschließend Silberfärbung zeigte Banden von ungefähr 80 kDa (Bande 2), die mit rekombinantem MIA (1µg/µl rek.MIA) verdrängt werden konnten (Bande 3) **B** Far Western mit biotinyliertem MIA. Die geblotteten RIPA-Zelllysate wurden mit biotinyliertem MIA inkubiert und die Proteinbindungspartner mit einem Streptavidin/AP-Zweitantikörper detektiert. Die Färbung wurde mittels NBT/BCIP durchgeführt. Hier wurden Banden bei ungefähr 70 und 80 kDa (Banden 1 und 2) sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigt die Kontrolle (Bande 3) keine Banden. Biot. MIA = biotinyliertes MIA.

Weil die gezeigten Bandenmuster der potentiellen Bindungspartner von MIA laut einiger Publikationen auf Integrine hinweisen, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen im anschließenden Western Blot spezifische Anti-Integrin-Antikörper eingesetzt wurden (Chun et al., 2001; Bi et al., 2001; Barazi et al., 2002). Hierbei stellte sich heraus, dass spezifische

Antikörper gegen Integrin alpha2 und Integrin alpha3 keine Immunreaktion mit dem Immunpräzipitat zeigten. Die Abbildung 4-18 A und B illustrieren jedoch, dass Antikörper gegen Integrin alpha4 und Integrin alpha5 spezifisch an die präzipitierten Proteine binden konnten. Die Abbildungen zeigen eine spezifische Färbung für alpha4 und alpha5 Integrine nach MIA-Ko-Immunpräzipitation von Melanozytenlysaten und den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei. In der Negativkontrolle beider Ko-Immunpräzipitationen wurde keine Bande sichtbar. In den Kontroll-Western Blots mit Lysaten zeigte alpha4 eine Bande bei 80 kDa (siehe Abbildung 4-18 C). Integrine werden in Zellen von Prokonvertasen proteolytisch gespalten bevor sie in der Zellmembran verankert werden. Diese Prozessierung von Integrin findet in Melanozyten in geringerem Ausmaß statt, weshalb in den Lysaten von Melanozyten eine deutlich sichtbare Bande der unprozessierten Form von Integrin alpha5 mit einem Molekulargewicht von 130 kDa erkennbar war. In Lysaten der Melanomzelllinie Mel Im dagegen war eine schwächere Färbung der 130 kDa Bande sichtbar. Daneben zeigten sich Banden bei 80 kDa (siehe Abbildung 4-18 C).



**Abbildung 4-18**

**Ko-Immunpräzipitation mit biotinyliertem MIA mit den Zelllysaten von Melanozyten (NHEM) und den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei.**

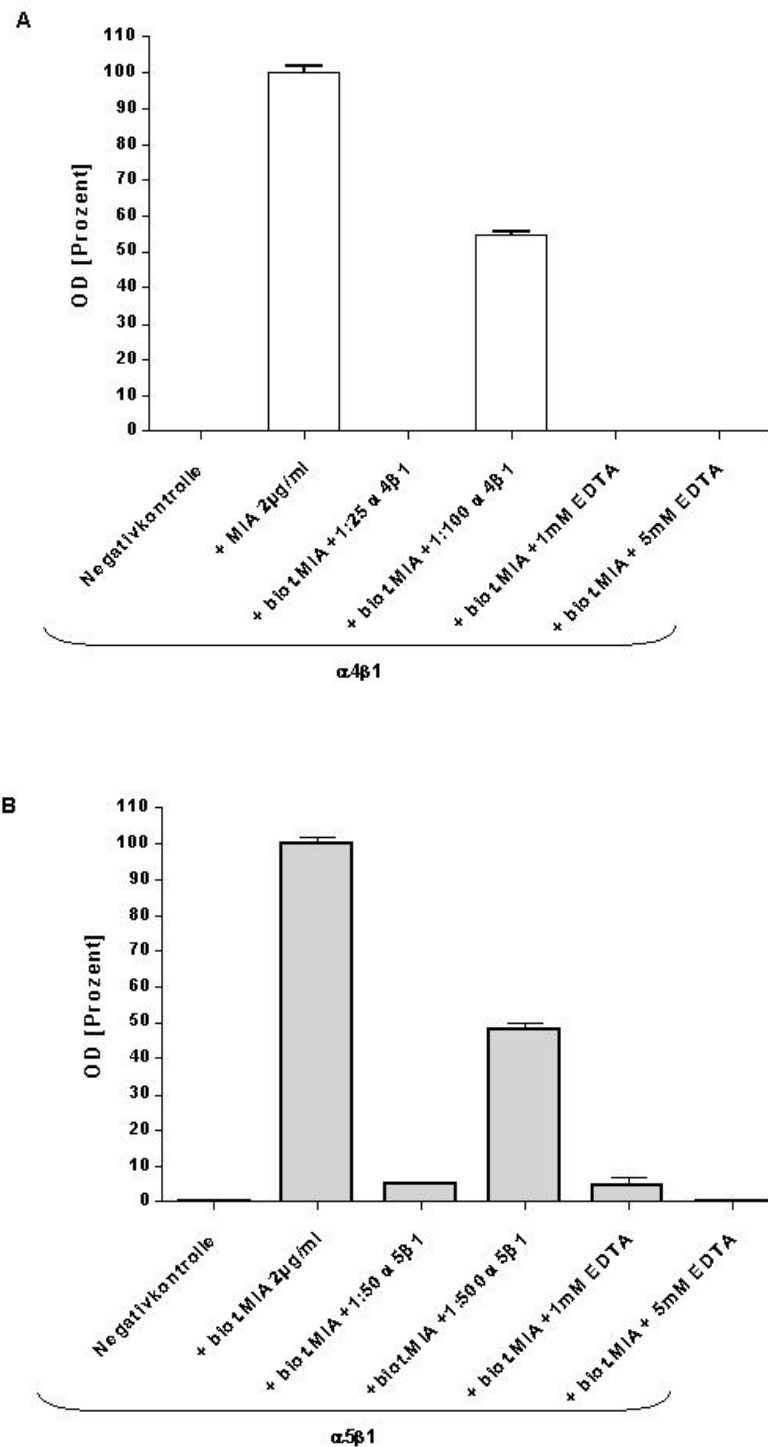
Nachfolgend wurden mit spezifischen Integrin alpha4 und alpha5 Antikörpern auf dem Western Blot sowohl die Bindung von MIA an alpha4 (A), als auch an alpha5 (B), festgestellt. Die Kontrolle zeigt jeweils Zelllysate von Melanomzellen ohne biotinyliertes MIA. C Western Blot mit RIPA Zelllysaten von Melanozyten und den Melanomzellen Mel Im mit Antikörpern gegen Integrine alpha4 und alpha5. Die Färbung mit alpha4 zeigte, dass in allen getesteten Lysaten die prozessierte Form vorhanden ist. Die Färbung mit dem Antikörper gegen Integrin alpha5 zeigt in Melanozyten die 130 kDa Form des Proteins. In den Zelllysaten der Melanomzelllinie Mel Im erscheinen jedoch auch kleinere Banden.

### 4.2.5 MIA bindet direkt an alpha4 beta1 und alpha5 beta1

Durch ELISA-Assays wurde bestätigt, dass MIA direkt an alpha4 und alpha5 Integrine binden kann. Hierbei wurden für Proteine hoch affine Platten mit dem jeweiligen Integrin beschichtet und Bindung von biotinyliertem MIA analysiert. Die Abbildung 4-19 A und B zeigen dass MIA sowohl an alpha4, als auch an alpha5 bindet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass lösliches alpha4 (Abbildung 4-19 A) und alpha5 (Abbildung 4-19 B) MIA in einer dosisabhängigen Weise verdrängen konnten. Weiterhin wurden gebundene Integrine mit 1 mM und 5 mM EDTA denaturiert. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen und hindert

## 4 Ergebnisse

Integrine so daran, ihre aktive Konformation einzunehmen. Beide Abbildungen veranschaulichen auch, dass MIA nicht an denaturierte Integrine bindet.



**Abbildung 4-19**

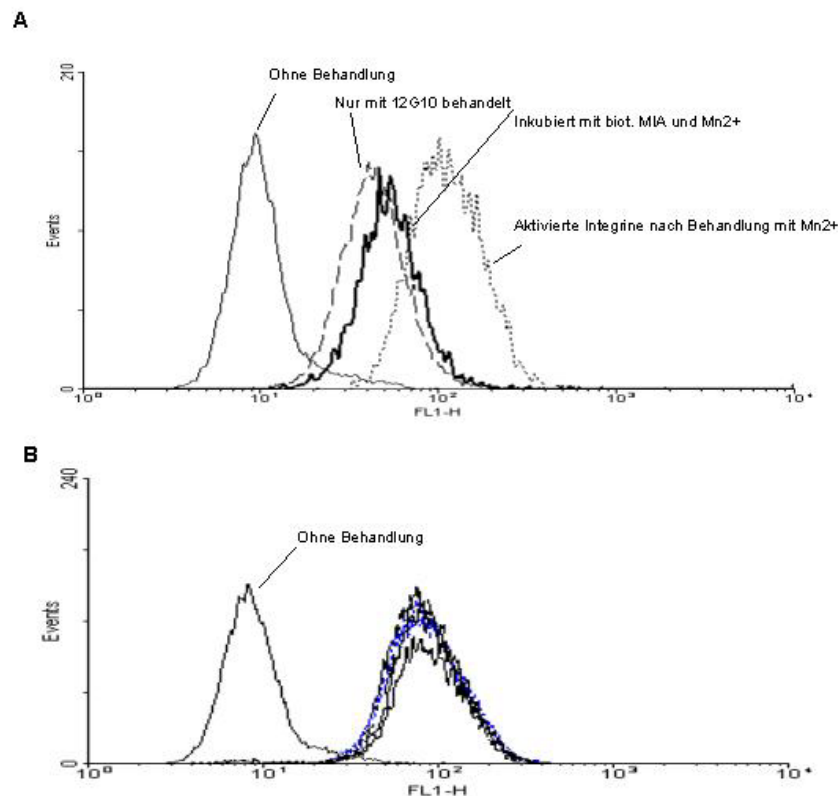
**Bindung von biotinyliertem MIA (2µg/ml) an die Integrine alpha4 beta1 (A) und alpha5 beta1 (B) im ELISA.**

Biotinyliertes MIA interagiert mit alpha4 beta1 (A) und mit alpha5 beta1 (B).

Die Interaktionen konnten durch schrittweise Zugabe zweier verschiedener Konzentrationen löslicher Integrine jeweils gehemmt werden (A und B jeweils Säulen 3/4). Durch Zugabe von EDTA in zwei verschiedenen Konzentrationen wurde die Interaktion von MIA mit den Integrinen ebenfalls gehemmt (A und B jeweils Säulen 5/6).

### 4.2.6 MIA inhibiert Integrinaktivität

In 4.2.2 wurde gezeigt, dass MIA die MAP-Kinase Aktivität inhibieren kann. Es ist außerdem bekannt, dass Integrine Signale über die MAP-Kinasen leiten. Deshalb stellte sich die Frage, ob MIA die MAP-Kinase Aktivität durch Bindung an Integrine hemmt und deren Signalweiterleitung inhibiert. Der Antikörper 12G10 wurde in FACS- Untersuchungen eingesetzt. Dieser ist spezifisch gegen aktivierte Integrine. Nach Standardpräparation der Melanomzellen für das FACS Experiment lagen die Integrine zunächst im inaktiven Zustand vor (siehe Abbildung 4-20 A, gestrichelte Linie). Um für das Experiment aktive Integrine zu erhalten, wurden sie mit 1 mM  $\text{MnCl}_2$  aktiviert (siehe Abbildung 4-20 A, gepunktete Linie). Nach Inkubation mit biotinyliertem MIA ergab sich eine Verringerung der Integrinaktivität (siehe Abbildung 4-20 A, durchgezogene Linie). Zudem hatte die MIA-Inkubation keinen Effekt auf Zellen, deren Integrinaktivität mit EDTA inhibiert wurde. Als Kontrolle wurde ein analoges Experiment mit einem aktivierungsunspezifischen Integrin beta1 Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 4-20 B). Hier zeigten sich nach MIA-Inkubation keine Veränderungen.



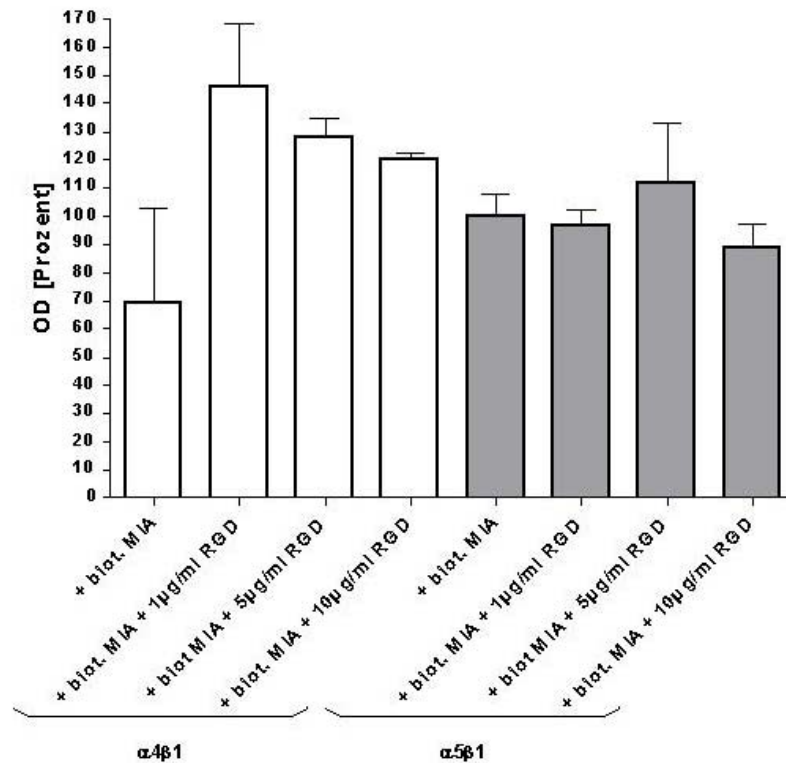
**Abbildung 4-20**

### Durchflußzometrische Untersuchung des Effekts von MIA auf aktivierte Integrine.

**A** MIA blockiert die Integrinaktivität. Die schwarze Linie stellt Mel Im Zellen ohne Behandlung mit biotinyliertem MIA und 12G10 Antikörper dar. Die gepunktete Linie zeigt aktivierte Integrine nach Behandlung mit  $Mn^{2+}$ . Die gestrichelte Linie zeigt Mel Im Zellen, die lediglich mit 12G10 behandelt wurden und die durchgezogene, schwarze Linie zeigt Mel Im Zellen, die mit biotinyliertem MIA und  $Mn^{2+}$  behandelt wurden. Die Abbildung stellt deutlich dar, dass MIA die Aktivierung der Integrine hemmt. **B** Das analoge Experiment wie in Abbildung A gezeigt, nur mit aktivierungsunabhängigem Antikörper anti-beta1. Hier zeigen die Zellen keinen Unterschied der Fluoreszenzintensität nach gleichwertiger Behandlung wie in Abbildung A.

### 4.2.7 Analyse der Interaktion zwischen MIA und Integrinen

Mittels ELISA wurde untersucht, ob biotinyliertes MIA von RGD-Peptiden an alpha4 beta1 oder alpha5 beta1 verdrängt werden kann. Dazu wurden die Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 auf hochaffine 96-Well Platten aufgetragen. Danach wurden sie jeweils mit  $1\mu\text{g/ml}$  biotinyliertem MIA und drei verschiedenen Konzentrationen RGD Peptid ( $1\mu\text{g/ml}$ ,  $5\mu\text{g/ml}$  und  $10\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Abbildung 4-21 zeigt, dass passend zu den Daten der ERK-Aktivierung (siehe Kapitel 4.2.2), die RGD-Peptide biotinyliertes MIA nicht von den jeweiligen Integrinen verdrängen konnten.



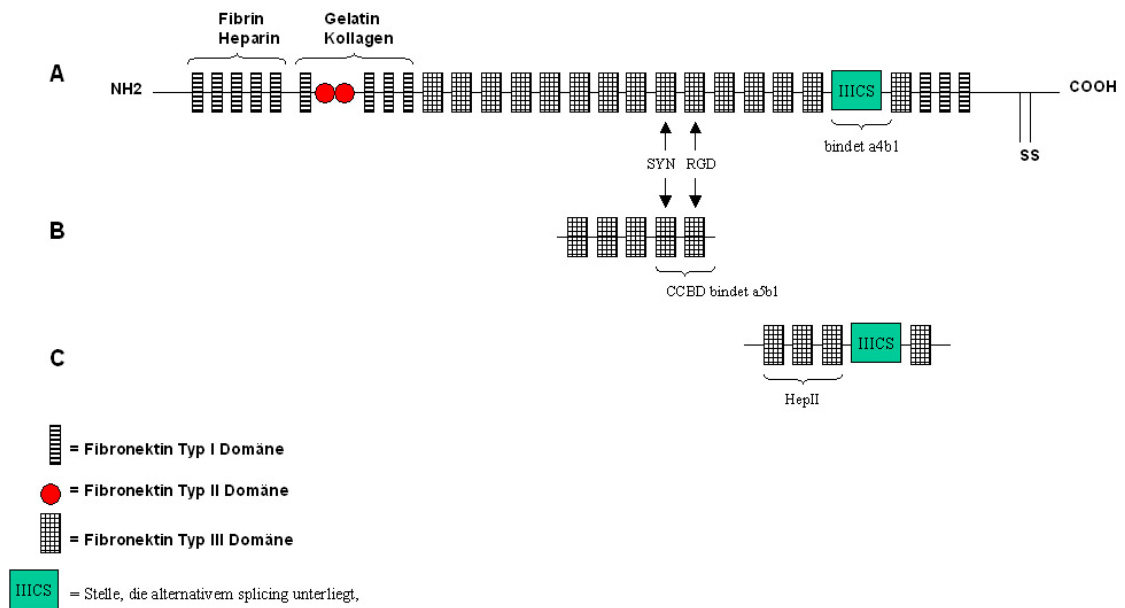
**Abbildung 4-21**

**Effekt des RGD Peptids auf die Verdrängung von MIA von den Integrinen  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$ .**

Die Auswertung des ELISAs zeigt dass das RGD Peptid in verschiedenen Konzentrationen MIA nicht von den Integrinen  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  verdrängen kann. Die weissen Säulen zeigen das Ergebnis von  $\alpha 4 \beta 1$  und die Säulen grauen Säulen von  $\alpha 5 \beta 1$ . Die Säulen welche nur mit biotinyliertem MIA inkubiert wurden, stellen die Positivkontrollen dar.

Narumiya et al. (1994) haben gezeigt, dass sowohl  $\alpha 4 \beta 1$ , als auch  $\alpha 5 \beta 1$  Integrine an Fibronektin binden können. Abbildung 4-22 A zeigt eine schematische Ansicht des Fibronektinmonomers. In dieser Arbeit wurden die Fibronektinfragmente 50K (siehe Abbildung 4-22 B) und H/120 (siehe Abbildung 4-22 C) im ELISA Assay eingesetzt, um den Einfluss der jeweiligen Domänen auf das Bindungsverhalten von biotinyliertem MIA an  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  zu untersuchen. Es wurde bereits gezeigt, dass H/120 spezifisch an  $\alpha 4 \beta 1$  binden kann und 50K spezifisch an  $\alpha 5 \beta 1$  bindet (Juliano et al., 2004). In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, den Einfluss dieser Fragmente auf die Bindung von biotinyliertem MIA an  $\alpha 4 \beta 1$  beziehungsweise  $\alpha 5 \beta 1$  zu untersuchen.



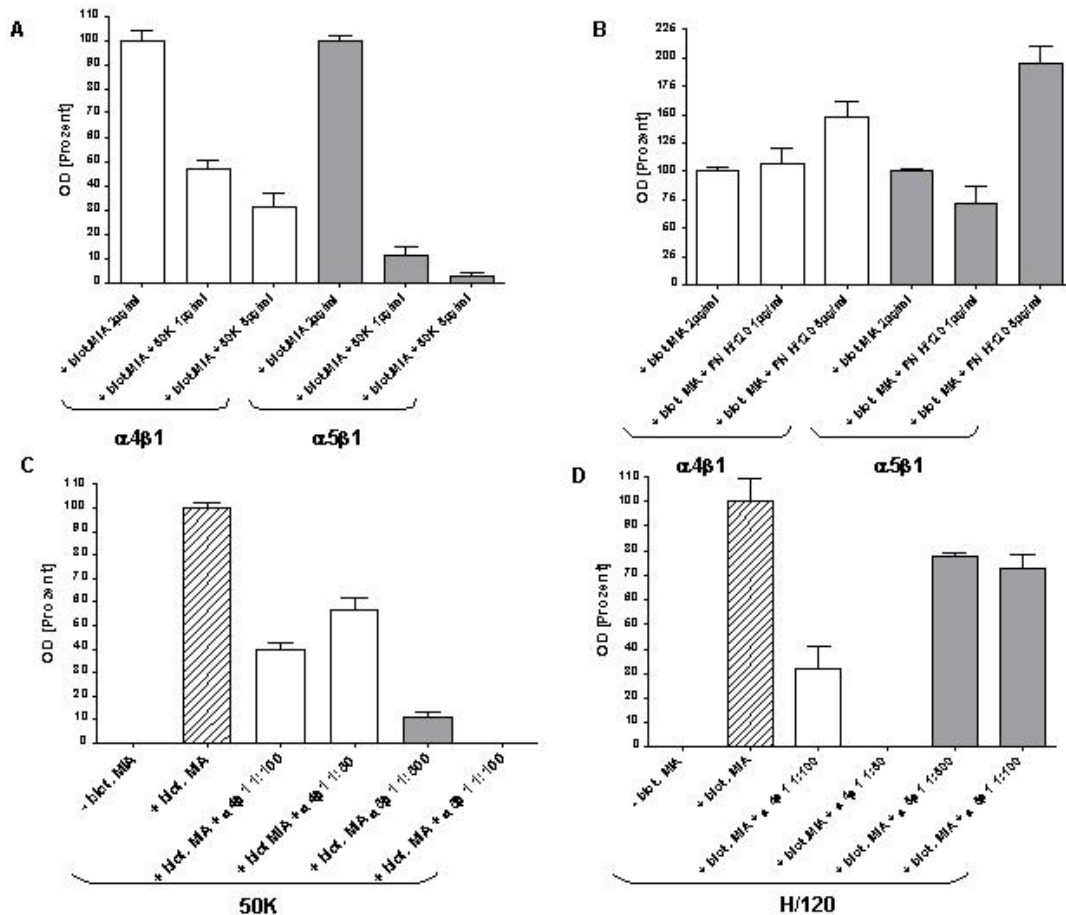


**Abbildung 4-22**

**A** Schematische Darstellung eines Fibronektinmonomers und seiner einzelnen Bindungsdomänen.

**B** Das Fragment 50K, mit spezifischer Bindungsstelle für das Integrin alpha5 beta1. **C** Das Fragment H/120 mit spezifischer Bindungsstelle für das Integrin alpha4 beta1.

In Abbildung 4-23 A ist zu sehen, dass das 50K Fragment in der Lage ist, MIA von alpha5 beta1 Integrinen in niedriger (1µg/ml) als auch in höherer Dosis (5µg/ml) zu verdrängen (graue Säulen). Das gleiche beobachtet man für Integrin alpha4 beta1, jedoch war hier die Verdrängung nicht so ausgeprägt (weiße Säulen). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 4-23 B, dass H/120 MIA nicht von alpha5 beta1 verdrängt. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml erhöht H/120 sogar die Bindung von MIA an alpha4 beta1 und alpha5 beta1 Integrine. Im Analogexperiment wurden jeweils beide Fibronektinfragmente, 50K und H/120, ausplattiert und untersucht, ob die löslichen Integrine MIA von den Fibronektinfragmenten verdrängen können. Abbildung 4-23 C zeigt dass Integrin alpha5 beta1 MIA dosisabhängig vom 50k Fragment verdrängte. alpha4 beta1 zeigte nur einen schwachen Verdrängungseffekt von MIA an 50K. Abbildung 4-23 D zeigt das gleiche Experiment mit dem alpha4 beta1-bindenden Fragment H/120. Hier verdrängte alpha4 beta1 MIA von H/120, alpha5 beta1 war dazu nicht in der Lage.



**Abbildung 4-23**

## ELISA Auswertung der Verdrängung von MIA von Integrinen (A/B) beziehungsweise Fibronektinfragmenten (C/D)

**A** Das ELISA-Experiment zeigt, dass das Fibronektinfragment FN 50K dazu in der Lage ist, biotinyliertes MIA von den Integrinen alpha4 beta1 (weiße Säulen) und alpha5 beta1 (graue Säulen) zu verdrängen. **B** Das Fragment FN H/120 übt einen additiven Effekt auf die MIA-Bindung an alpha4 beta1 (weiße Säulen) und alpha5 beta1 (graue Säulen) aus. **C** alpha4 beta1 (weiße Säulen) bewirkt eine leichte Verdrängung von biotinyliertem MIA von 50K. alpha5 beta1 (graue Säulen) verdrängt biotinyliertes MIA vollständig von 50K. **D** alpha4 beta1 (weiße Säulen) verdrängt biotinyliertes MIA von H/120 vollständig. alpha5 beta1 (graue Säulen) bewirkt keine Verdrängung an diesem Fragment. biot. MIA= biotinyliertes MIA,

## 5 Diskussion

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Analyse von Veränderungen in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Assoziation, die im Rahmen der Entstehung des malignen Melanoms von Bedeutung sein könnten. Hierbei konnten zwei Veränderungen charakterisiert bzw. weiter aufgeklärt werden. Zum einen wurde in allen untersuchten Melanomzellen (*in vivo* und *in vitro*) ein trunkiertes, lösliches Fragment von P-Cadherin gefunden, welches sezerniert wird und möglicherweise durch eine Verdrängungsreaktion der normalen Zell-Zellkontakte die Loslösung von entarteten Zellen aus dem Zellverband begünstigt. Zum anderen wurden Interaktionspartner des Proteins MIA gesucht. MIA wird von Melanomzellen ebenfalls sezerniert, blockiert jedoch dabei die Kontakte zur extrazellulären Matrix. Es wurde dargelegt, dass MIA in der Lage ist mit den Fibronektinrezeptoren  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  zu interagieren. Außerdem wurde demonstriert, dass MIA an aktivierte Integrine bindet und diese inaktivieren kann. Es wurde zudem gezeigt, dass durch Inkubation von Melanomzellen mit MIA eine Verminderung der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK 1/2 bewirkt wird. Welche Auswirkungen und mögliche Mechanismen hinter beiden Aspekten der malignen Tumorentstehung der Haut stecken, soll im folgendem Kapitel diskutiert werden.

### ***5.1 Identifikation einer trunkierten Form von P-Cadherin im malignen Melanom***

Es gibt bereits vielfältige Studien, welche die Rolle der klassischen Typ I Cadherine E N- und P-Cadherin im malignen Melanom untersuchten. Hsu et al. (1996) zeigten mittels biochemischer Methoden, Ko-Kulturmethode und durchflußzytometrischen Analysen einen Wechsel von E-Cadherin Expression zu N-Cadherin Expression in Melanomzellen. Für E-Cadherin wurde der Verlust in der Tumorgenese auf die vermehrte Expression seines Repressors *snail* zurückgeführt (Poser et al., 2001). Auch Für P-Cadherin wurde ein Verlust in allen untersuchten Melanomzellen beschrieben (Hsu et al., 1996). Seline et al. (1996) beobachteten mittels der oben genannten Methoden ebenfalls einen Verlust der P-Cadherinexpression im malignen Melanom mit fortschreitendem

Krankheitsstadium. Mit der in dieser Publikation verwendeten Immunfluoreszenzmikroskopie und der durchflußzytometrischen Analyse wurde die verminderte Expression von P-Cadherin aber lediglich an der Zelloberfläche detektiert (Seline et al., 1996). Untersuchungen über P-Cadherinexpression in Melanomzellen mit anderen Methoden als den oben erwähnten, wurden noch nicht durchgeführt. In dieser Arbeit wurde mittels Western Blot Analyse gezeigt, dass P-Cadherin im malignen Melanom *in vivo* und *in vitro* exprimiert wird, jedoch in geringer Konzentration und in einer verkürzten Form mit einem Molekulargewicht von 50 kDa (P-Cad50). Diese trunkierte Form wurde sowohl in allen untersuchten Melanomzelllinien als auch in Gehirn-, Lungen- und Hautmetastasen von Melanompatienten gefunden. Shimoyama et al. (1989) beschrieben P-Cadherin ursprünglich mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (P-Cad120) und 3 NH<sub>2</sub>-gekoppelten Glykosylierungsstellen. Unsere Studien haben gezeigt, dass der C-terminale Bereich von P-Cad120 mittels Western Blot in P-Cad50 nicht detektiert werden konnte. Zunächst wurde angenommen, dass eine Mutation im *P-Cadheringen* (*Cdh3*) für die Verkürzung von P-Cad50 verantwortlich war. Mutationen in *Cdh3* sind bereits bekannt. Sprecher et al.(2001) identifizierten eine Deletion in Exon 8, welche einen *frameshift* bewirkt, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führt. Die Mutation führt beim Menschen zu frühem Haarausfall während der Entwicklung und zu vorzeitiger Erblindung. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden daher alle kodierenden Bereiche des Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Dabei wurde festgestellt, dass weder Mutationen innerhalb der Exone, noch an den Exon/Intron Grenzen für die verkürzte Form verantwortlich sind. Somit ist auszuschließen, dass eine Mutation im genomischen Bereich für das trunkierte P-Cadherin verantwortlich ist.

Nun stellte sich die Frage, ob die Trunkierung eine Folge von alternativem Spleißen des *P-Cadheringens* war. Dazu wurde die mRNA von P-Cadherin analysiert. Hier stellte sich heraus, dass die kodierenden Bereiche der Exone 1 bis 10 in der mRNA in Zellen des malignen Melanoms vorhanden sind, jedoch alle Bereiche, welche die Exone 11 bis 16 kodierten, fehlen (siehe schematische Ansicht der Abbildung 4-10). Damit fehlt in Melanomzellen auch der der Transmembranregion entsprechende Bereich der mRNA, welcher von den Exonen 13 und 14 kodiert wird. Dieses Ergebnis bestätigt das weiter oben

aufgeführte Fehlen des C-Terminus des Proteins. Man kann daher ableiten, dass P-Cad50 nicht in der Membran der Melanomzellen verankert ist. Niemann et al. (2000) zeigten für T-Cadherin, dass dies mittels eines Glykosylphosphatidylinositol Ankers mit der Zellmembran von glatter Gefäßmuskulatur verbunden ist. Diesem Cadherin fehlt die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Bereich. Eine derartige Verankerung des P-Cadherinfragments ist jedoch ausgeschlossen, weil für diese Modifikation ein hydrophober COOH-Terminus vorhanden sein müsste (Ferguson and Williams, 1988).

Das N-terminale Fragment von P-Cadherin wurde weiterhin in Zellkulturüberständen von Melanomzelllinien detektiert. Dies war eine Bestätigung für die Sezernierung des Proteins. Um sicherzustellen, dass die trunkierte Form von P-Cadherin kein Zellkulturartefakt darstellt, wurden sowohl an normaler Haut als auch an Primärtumoren und Metastasen des malignen Melanoms immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hier zeigten Melanozyten und Keratinozyten eine spezifische Membranfärbung. Im Gegensatz dazu fehlte diese membranassoziierte Färbung in Primärtumoren und Metastasen und es zeigte sich hier stattdessen eine schwache zytoplasmatische Färbung. Bei einer kaum sichtbaren Färbung im Zytoplasma kann man davon ausgehen, dass das Protein entweder vermehrt im Zytoplasma abgebaut wird, oder es ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sezerniert wird.

Da die Hauptglykosylierungsstellen in P-Cad120 im kodierenden Bereich für Exon 12 liegen (Shimoyama et al., 1989) und dieser Bereich der mRNA von P-Cad50 fehlt, kann man davon ausgehen, dass das fragmentierte Protein keine Glykosylierungen aufweist. Mit Hilfe des Internet-Softwareprogramms *NCBI model maker* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/modelmaker.cgi?contig=NT\\_010498.15&gene=CDH3&lid=1001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/modelmaker.cgi?contig=NT_010498.15&gene=CDH3&lid=1001)) wurde das Molekulargewicht des trunkierten Proteins bestimmt. Dabei wurden die ersten 10 Exone des *Cdh3-Gens* zur Berechnung verwendet. Das Ergebnis war ein offener Leserahmen, der 1622 Nukleotide beziehungsweise 540 Aminosäuren umfasst. Das daraus berechnete Molekulargewicht des Proteins entspricht 52 kDa, was der Größe der im Western Blot detektierten Banden entspricht (siehe Abbildung 4-2).

Von verschiedenen Molekülen weiß man, dass diese durch *alternatives Spleißen* sowohl als sezernierte, als auch membrangebundene Form exprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehören zum Beispiel CD44, der Leptinrezeptor oder der Tumornekrosefaktor 2 (Tolboom et al., 2004; Yang et al., 2004; Lainez et al., 2004). Auch von anderen Cadherin-Familienmitgliedern wie den Protocadherinen weiß man, dass ihre mRNA in verschiedenen Formen auftritt (Blanco-Arias et al., 2004). Für Cadherine vom Typ II werden in der Literatur mehrfach unterschiedliche Spleißvarianten dargestellt. Für Cadherin-11 und PB-Cadherin werden, neben den vollen Größen, jeweils trunkierte Formen beschrieben. Diese gespleißten Formen besitzen intakte Transmembrandomänen und zytoplasmatische Domänen. Von Cadherin-11 existiert zusätzlich eine sezernierte Form, von der vermutet wird, dass sie die Zell-Zelladhäsion zwischen Mammakarzinomzellen blockieren könnte, und damit die Migration dieser Zellen erheblich fördern könnte (Feldes et al., 2003; Kawaguchi et al., 1999; Sugimoto et al., 1996). Auch von Cadherin-7, welches in der Hühnerembryogenese eine Rolle spielt, existiert eine lösliche, sezernierte Spleißvariante. Diese Form besteht lediglich aus vier extrazellulären Domänen und weist weder eine Transmembrandomäne, noch eine zytoplasmatische Domäne auf. Diese Spleißform tritt während der Entwicklung nur in Gewebe auf, in dem extreme Zellbewegungen beobachtet werden. Auch hier wird vermutet, dass die sezernierte Spleißform von Cadherin-7 durch Blockierung der homophilen Interaktion zwischen Volllänge-Cadherin-7 die Adhäsion zwischen Zellen inhibiert (Kawano et al., 2002). Um zu untersuchen ob alternatives Spleißen für die trunkierte Form von P-Cadherin verantwortlich ist, wurden die kodierenden Bereiche die den Exonen 8 bis 16 entsprechen mittels PCR amplifiziert. Die Ergebnisse zeigten jedoch kein verkürztes PCR-Produkt, welches auf *alternatives Spleißen* hingedeutet hätte. Auch die Analyse des 3'untranslatierten Bereiches ergab keine Hinweise darauf. Zudem wiesen nach PCR-Amplifizierung und Sequenzierung des 3'Endes der P-Cadherin cDNA (3'RACE) nur die Positivkontrollen (Keratinocyten) ein 3'mRNA-Ende von wildtyp P-Cadherin auf. Aufgrund dieser Studien konnte in dieser Arbeit *alternatives Spleißen*, als potentieller Mechanismus für die Expression einer trunkierten Form von P-Cadherin ausgeschlossen werden.

Wegen des oben beschriebenen Verlustes des C-Terminus und der Transmembrandomäne von P-Cad50 bereits auf der Ebene der mRNA, kann eine Trunkierung aufgrund proteolytischer Spaltung ebenfalls ausgeschlossen werden. Für E-Cadherin wird ein derartiger Mechanismus beschrieben, wobei das Protein von Matrixmetalloproteinasen Matrilysin und Stromelysin an der Zelloberfläche gespalten wird. Dabei diffundiert lösliches E-Cadherin in den Interzellularraum und induziert dabei durch Inhibition von E-Cadherin abhängiger Zelladhäsion die Invasionsfähigkeit der Zellen (Noe et al., 2001). Auch Marambaud et al. (2002) beschrieben, dass E-Cadherin mit Hilfe der Presenilin-1/Gamma Sekretase proteolytisch in zwei kürzere Fragmente gespalten werden kann. Diese Spaltung erfolgt jedoch nur an der Grenze zwischen Membran und Zytoplasma. Dabei bleibt das Fragment mit der Transmembrandomäne in der Membran zurück und der zytoplasmatische Teil wird in das Zytosol entlassen, von wo er weitere Effekte auf den Wnt-Signalweg ausübt. Für P-Cadherin wurde bislang nur beschrieben, dass es in menschlicher Muttermilch durch Proteolyse als lösliches 80 kDa Fragment auftritt. Dabei wird es im Serum bei Frauen mit und ohne Brustkrebs detektiert. Die Rolle, die dieses P-Cadherinfragment in der Muttermilch spielt, ist bislang jedoch noch unklar (Soler et al., 2002; Knudsen et al., 2000).

Als weitere Möglichkeit für eine Trunkierung könnte eine chromosomale Translokation für die kurze Variante von P-Cadherin verantwortlich sein. Das *P-Cadherin- Gen (Cdh3)* ist auf dem humanen Chromosom 16q22.1 lokalisiert. Diese Region ist von besonderem Interesse für die Tumorforschung, da es Untersuchungen gibt, die auf chromosomale Veränderungen in diesem Bereich hindeuten. Diese beinhalten auch Inversionen und Allelverluste im malignen Melanom (Morse et al., 1993; Chalmers et al., 1999; Yu et al., 1997; Latil et al., 1997; Oliveira et al., 2004; Tobal et al., 1995; Vajdic et al., 2003; Wiltshire et al., 2001). Dieser Bereich umfasst eine Ansammlung der Cadheringene *Cdh1*, *Cdh3*, *Cdh5*, *Cdh8* und *Cdh11* (Chalmers et al., 2001). Eine Translokation oder Bruch in einem Teil zwischen Exon 10 und 11 des *Cdh3- Gens* würde erklären, wieso alle Exone auf genomischer Ebene nachgewiesen werden konnten. (siehe Abbildung 4-9 A). In der mRNA sind dagegen nur die kodierenden Bereiche für die ersten 10 Exone vorhanden (siehe Abbildung 4-10 C). Auch fragile Bereiche in Chromosomen sind in Tumoren beschrieben und stellen

einen Ausgangspunkt für Chromosomenbrüche dar. Diese Brüche werden in bestimmten Tumoren mit Translokationen, Amplifikationen oder Deletionen in Zusammenhang gebracht (Karadag et al., 2002; Smith et al., 1998; Glover et al., 1988). Auch auf Chromosom 16 existiert eine fragile Stelle in der Nähe des *Cdh3- Gens*, FRA16B. Diese befindet sich in 16q22.1 und wird mit chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht (Yu et al., 1997; Mangelsdorf et al., 1997). Eine Instabilität in diesem Bereich könnte schließlich zu einer Translokation im P-Cadherin führen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde gezeigt, dass *Cdh3* auf genomischer Ebene keinerlei Mutationen aufweist und deshalb Veränderungen an Exon/Intron Grenzen oder vorzeitige Transkriptionsabbrüche aufgrund von *frameshift*-Mutationen nicht für die Verkürzung von P-Cadherin im malignen Melanom verantwortlich sind. Nach Analyse der mRNA stellte sich heraus, dass deren 3'Ende ab Exon 10 fehlt. Es konnten jedoch keine Hinweise auf *alternatives Spleißen* gefunden werden. In weiteren Arbeiten, zum Beispiel mit fluoreszierender *in situ* Hybridisierung, wäre zu klären, ob chromosomale Translokation für die Trunkierung verantwortlich ist.

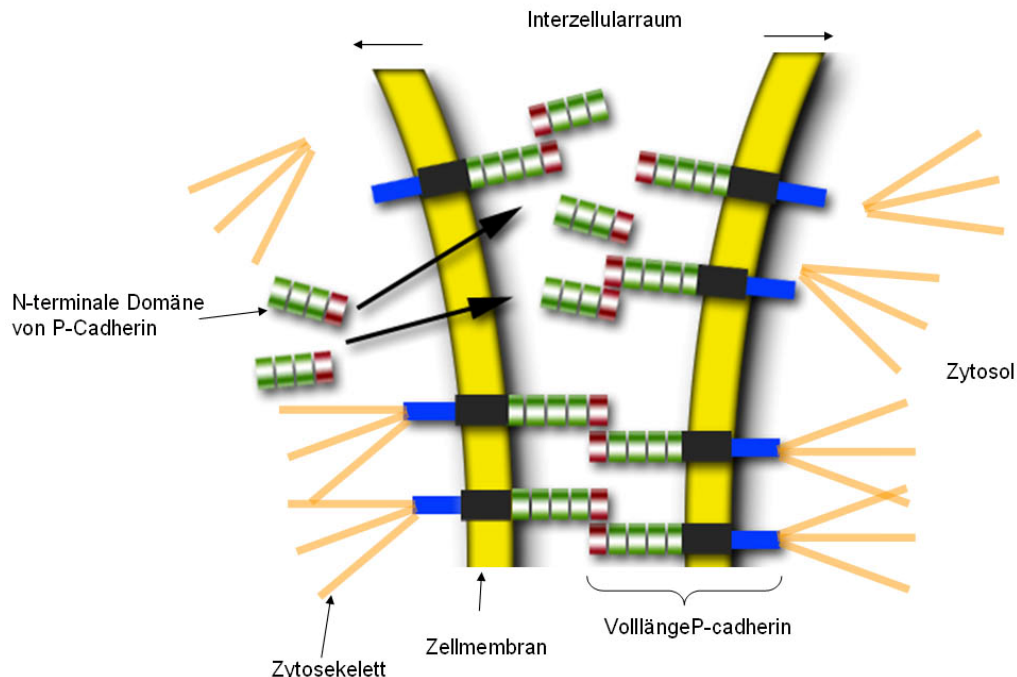
Die Funktion von sezerniertem P-Cadherin in Melanomzellen muss noch genauer untersucht werden. In der Literatur, die mehrfach das Phänomen von sezernierten Proteinfragmenten beschreibt, erschließen sich jedoch Gründe für das Vorhandensein des verkürzten P-Cadherins in Melanomzellen. Radice et al. (1997) zeigten, dass P-Cadherin defiziente Mäuse lebensfähig sind und es zu einer vorzeitigen Differenzierung der Brustdrüsen kommt. Außerdem wiesen die Mäuse mit zunehmendem Alter im Brustdrüsenepithel Hyperplasien und Dysplasien auf. Sie zeigten jedoch keine malignen Veränderungen in der Epidermis der Haut oder den Melanozyten. Dies kann auch an der redundanten Funktion der Cadherine liegen, das heißt E-Cadherin könnte theoretisch die Funktion von P-Cadherin übernehmen (Lewis et al., 1994). Ein in malignen Zellen sezerniertes P-Cadherinfragment könnte eine Verdrängungsreaktion der homophilen Interaktion von membranverankertem P-Cadherin auslösen. Dadurch käme es zu einer Lockerung des Zell-Zellkontaktes und dies wäre ein weiterer Schritt in Richtung Migrationsfähigkeit und Metastasierung von entarteten Zellen. Funktionell könnte lösliches P-Cadherin also einen dominant-negativen Effekt haben. Dominant negative Einflüsse von löslichen Rezeptoren



wurden zum Beispiel für CD44 oder FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) beschrieben. Diese Studien zeigten, dass lösliches CD44 das Wachstum von Melanomen inhibiert, indem es die Bindung von membrangebundenem CD44 an Hyaluronsäure verhindert (Ahrens et al., 2001). Auch die lösliche Form von FGFR3, die durch *alternatives Spleißen* entsteht, reguliert die Funktion von membrangebundenem FGFR (Jang et al., 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die oben erwähnte Isoform von Cadherin 11 mit fehlender Transmembrandomäne und Zytoplasmadomäne im Mammakarzinom die Migration und Invasion der entarteten Zellen fördert (Feldes et al., 2003). Weiterhin wurde bewiesen, dass die lösliche Form von E-Cadherin die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP erhöht und so die Zellinvasion *in vitro* begünstigt (Noe et al., 2000; Nawrocki-Rabi et al., 2003). Auch die lösliche Form des *Spleißproduktes* von Cadherin 7 im Huhn interagiert mit dem Cadherin 7 voller Länge. Auf diese Weise inhibiert Cadherin 7 die Zell-Zelladhäsion (Kawano et al., 2002).

In Analogie zu den genannten Studien könnte man spekulieren, dass die in dieser Arbeit identifizierte lösliche Form von P-Cadherin im malignen Melanom die homophile Interaktion zwischen Zellen blockiert und verdrängt. Damit wäre es maligne transformierten Zellen möglich sich aus ihrem Zellverbund zu lösen. Als Reaktion auf diese Loslösung werden zytoskelettale Veränderungen in der Zelle ausgelöst, die womöglich wiederum Signale in die Zelle leiten, welche dann zur weiteren Transformation zur Tumorzelle beitragen. Nelson et al. (2003) zeigen beispielsweise dass VE-Cadherin in der Lage ist die Proliferation von Zellen gleichzeitig zu stimulieren und zu inhibieren. Dieser Mechanismus beruht auf der Änderung der Zytoskelettstruktur, welche durch Blockierung oder Aktivierung von VE-Cadherin induziert wird. Abbildung 5-1 illustriert den hypothetischen Wirkmechanismus von sezerniertem P-Cad50. Ein weiterer Hinweis der diese Hypothese bestätigt, sind im Zuge dieser Arbeit gemachte Untersuchungen an *tissue microarrays*. Dabei wurde ein signifikanter Verlust von membranständigem P-Cadherin mit zunehmender Tumordicke und *Clark Level* festgestellt. Durch die Verschiebung der Expression von membranständigem P-Cadherin hin zu einem sezernierten Protein mit zunehmender Progression des Tumors wird es den Zellen möglicherweise

erleichtert auszuwandern. P-Cad50 könnte deshalb die Migration und Metastasierung der Zellen des malignen Melanoms begünstigen.



**Abbildung 5-1**

**Potentielle Funktion von P-Cad50 bei der Ablösung der Zellen von ihrer Umgebung.** Trunkiertes P-Cadherin wird von der malignen Zelle sezerniert und verdrängt die homophilen Interaktion zwischen membranständigem P-Cadherin.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden mögliche Rezeptoren des Proteins MIA und Signalwege, die es beeinflusst, untersucht. Frühere Studien zeigten die direkte Interaktion von MIA mit verschiedenen Matrixproteinen, wie Fibronectin oder Laminin (Bosserhoff et al., 2003). Spezifische Oberflächenrezeptoren oder von MIA regulierte Signalwege wurden bisher jedoch noch nicht charakterisiert. Im nachfolgenden Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse diskutiert, die belegten, dass MIA an die Integrine  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  auf Melanomzellen binden kann. Weiterhin wird gezeigt, dass MIA in der Lage ist diese Fibronectin- und Lamininrezeptoren zu inaktivieren und dadurch möglicherweise den mitogenen Signalweg ERK 1/2 negativ reguliert.

### **5.2 Regulation des MAP-Kinase Signalweges über MIA**

Die Untersuchung des MAP-Kinase Signalweges zeigte einen starken Rückgang der Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2, nachdem Melanomzellen *in vitro* mit MIA inkubiert wurden. Die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und JNK

zeigte dagegen keine Veränderung. Nun galt es herauszufinden, ob diese Verringerung der Aktivität eine Folge der Ablösung der Zellen von der Oberfläche durch MIA-Bindung an die RGD-Bindungsstellen von Fibronectin war oder ob die Bindung von MIA an einen eigenen, spezifischen Oberflächenrezeptor dafür verantwortlich war. Deshalb wurde durch Verwendung von RGD-Peptid, das ebenfalls eine Ablösung der Zellen von Fibronectin auslöst, untersucht, ob sich der ERK-Phosphorylierungsgrad auch veränderte. Die Inkubation von Melanomzellen mit RGD-Peptid induzierte jedoch lediglich eine schwache Reduktion der ERK 1/2 Phosphorylierung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass MIA die ERK 1/2 Aktivität über eine andere Wechselwirkung als die von RGD-Bindungsstellen steuert. Dies könnte entweder durch die direkte Bindung an ein anderes Epitop der Integrine, oder an einen bisher unbekannten Zelloberflächenrezeptor geschehen.

### ***5.3 Bindung von MIA an Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1***

Die folgenden Untersuchungen zeigten, dass MIA direkt an die Oberfläche der Zellen binden kann. Um auszuschließen, dass die Bindung von MIA an die Zelloberfläche daher rührt, dass es an vorhandenes Fibronectin bindet, wurden Fibronectin positive und Fibronectin negative embryonale Mausfibroblasten mit MIA inkubiert. Die darauf folgende Auswertung der FACS-Analyse offenbarte keine Unterschiede in der Bindung von MIA an die Zelloberfläche, weder an Fibronectin positiven (FN +/+) noch an Fibronectin negativen (FN -/-) Zellen. Damit wurde ausgeschlossen, dass die beobachtete Bindung ein Effekt der Bindung von MIA an Matrixmoleküle der Zelloberfläche ist und es wurde vermutet, dass MIA direkt an ein Protein auf der Zelloberfläche bindet. Mittels unterschiedlicher Methodiken, mittels Ko-Immunpräzipitationen, Far-Western Blot und ELISA wurde gezeigt, dass MIA spezifisch an die Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 binden kann. Diese Integrine werden im malignen Melanom vermehrt exprimiert und vermitteln die Bindung der Zellen an das Extrazellulärmatrixmolekül Fibronectin oder Laminin. alpha4 stellt hierbei eine Ausnahme dar, weil es neben der Zell-Matrix Verbindung auch Zell-Zellkontakte vermittelt. Gewöhnlich wird Integrin alpha4 beta1 von

Lymphozytensubpopulationen exprimiert und kann an das Zelloberflächenmolekül VCAM-1 an aktivierten Endothelzellen binden.  $\alpha 4 \beta 1$  Expression ist charakteristisch für fortgeschrittene Primärtumoren und die Expression dieses Integrins könnte dem Tumor erlauben, ausgehend vom vaskulären System in jedes Gewebe einzuwandern, welches VCAM-1 exprimiert (Garofalo et al., 1995). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$  vermehrt in primären und metastasierendem Gewebe exprimiert werden (Mortarini et al., 1992; Friedl et al., 1998; Natali et al., 1993). In den Ko-Immunpräzipitationsexperimenten zeigten sich  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  Integrinbanden bei einem Molekulargewicht von 70 und 80 kDa. In der Literatur wurde mehrfach gezeigt, dass die 150 kDa schweren Pro-Proteinformen der Integrine  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  von Pro-Proteinkonvertasen proteolytisch gespalten werden. Integrin  $\alpha 4$  wird im post-endoplasmatischen Retikulum in ein C-terminales 70 kDa und ein N-terminales 80 kDa Fragment gespalten, wobei beide Domänen nicht-kovalent miteinander verbunden sind {Teixido et al., 1992; Bergeron et al., 2003}. Genau diese Fragmente wurden auch in Veröffentlichungen gezeigt, die dieselben Antikörper gegen  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  benutzten {Barazi et al., 2002; Hyduk et al., 2004; Chun et al., 2001}. Aus dem Bandenmuster der Western Blots der Zelllysate kann man erkennen, dass in Normalzellen (Melanozyten) lediglich die schwere Isoform (130 kDa) der  $\alpha 5$  Integrine auftrat, wohingegen in der Melanomzelllinie Mel Im beide Formen der  $\alpha 5$  Integrine, sowohl die prozessierte (70-80 kDa) als auch die unprozessierte, detektierbar waren (siehe Pfeile bei Abbildung 4-18 C). Die Proteinbanden die in den Zelllysaten das niedrigere Molekulargewicht bei 70-80 kDa zeigen, könnten die Proteinformen von Integrin  $\alpha 5$  sein, welche im Ko-Immunpräzipitationsexperiment mit MIA interagieren.

Mittels des monoklonalen Mausantikörpers 12G10 wurde in FACS Analysen bestätigt, dass MIA an aktivierte Integrine bindet und diese inaktiviert. 12G10 erkennt das Kation-regulierte MIDAS-Motif (*metal ion depending site*) in der  $\beta 1$ -Integrinuntereinheit. Bei Bindung von  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  an diesen Bereich werden Integrine aktiviert. Diesen Aktivitätsstatus detektiert 12G10 (Humphries, 2004). MIA bindet aber, wie gezeigt, an die Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten. Die offenbarte Inaktivierung der Integrine ließe sich auf die Konformationsänderung der Integrin  $\alpha$ -Untereinheit durch MIA zurückführen. Diese

Konformationsänderung würde dann die Bindung der Kationen an das MIDAS-Motif behindern. Somit werden Integrine nicht mehr in einen aktivierten Zustand überführt und der Antikörper 12G10 kann das Aktivierungsepitop nicht mehr erkennen. Czekay et al. (2003) beschreiben eine Inaktivierung von Integrinen und dem Komplex uPA-uPAR (Urokinase Plasminogen-Aktivator/Plasminogenaktivator-Rezeptor) durch (PAI)-1 (*plasminogen activator inhibitor*). Durch diese Inaktivierung kommt es zum Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix. Der Wirkmechanismus von (PAI)-1 ist spezifisch für die Interaktion von Integrin mit Vitronektin. Durch die Deaktivierung der Integrine durch MIA wäre ein analoger Mechanismus spezifisch für Integrin-Fibronektin-Wechselwirkungen in Melanomzellen denkbar. Die Tatsache, dass Integrine an der ERK 1/2 Signalkaskade beteiligt sind {Juliano et al., 2004}, bestätigt zudem die Daten, dass nach Inkubation von Melanomzellen mit MIA die Phosphorylierung von ERK 1/2 verringert wird.

MIA fördert die Migration und Invasion von Zellen (Bosserhoff et al., 2001). Für die Zellbewegung sind hauptsächlich drei miteinander verknüpfte Vorgänge verantwortlich: Das Anheften des anterioren Bereiches der Zelle, Zellkontraktion und das Ablösen des posterioren Bereiches vom Substrat. Melanomzellen zeigen bei Zugabe von MIA, im Vergleich zur MIA-Sezernierung, Unterschiede in der Migrationsfähigkeit. Deshalb besteht die Hypothese, dass in MIA-sezernierenden Zellen ein gerichteter Transport des Proteins zum posterioren Teil der wandernden Zelle erfolgt. Abbildung 5-2 zeigt die Sezernierung von MIA am sich ablösenden Bereich der Zelle, wobei es, gemäß den Daten dieser Arbeit, an die Fibronektinrezeptoren  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  binden kann. MIA geht eine Wechselwirkung mit aktivierten Integrinen ein und inaktiviert diese. Die Bindung von löslichem MIA an Fibronektin erleichtert der Zelle das Ablösen vom Substrat (siehe auch Kapitel 2.6.1).

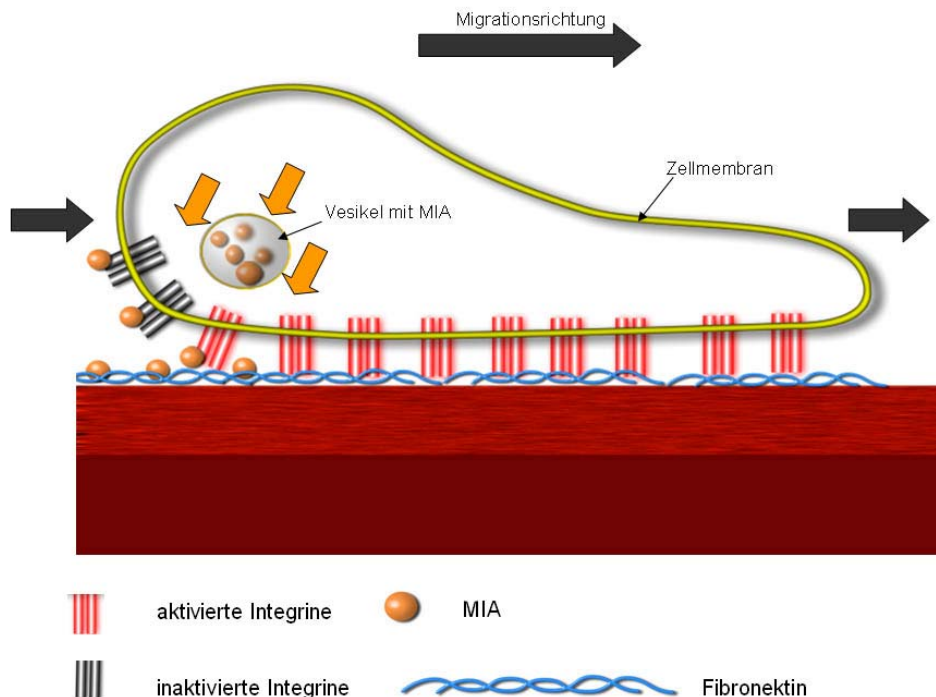


Abbildung 5-2

**Schematische Darstellung der Funktion von MIA**

MIA wird vermutlich gerichtet am hinteren Ende der wandernden Zelle sezerniert (orange Pfeile). Dort maskiert es die Bindungsstellen der Extrazellulärmatrixproteine und blockiert somit die Wechselwirkungen mit Integrinen. Zusätzlich bindet an aktivierte Integrine  $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$ , und deaktiviert sie.

Integrine werden in wandernden Zellen am posterioren Ende endozytiert und mittels des endosomalen Transportweges in die Plasmamembran an der Migrationsfront der Zelle erneut eingebaut (= *integrin recycling*) (Woods et al., 2004). Die Bindung von MIA an aktivierte Integrine am sich ablösenden Ende der migrierenden Zellen, könnte vermehrte Endozytose der Integrine und ihr anschließendes *Recycling* in den anterioren Bereich der Zellen bewirken. Hierbei sei nochmal auf die Analogie mit dem Integrin-inaktivierenden Protein (PAI)-1 verwiesen, welches die Bindung des uPA-uPAR-Integrin-Komplexes mit LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) vermittelt. Aufgrund dieser Bindung kommt es zur Verteilung der Integrinkomplexe in Clathrin beschichtete Vesikel (*clathrin coated pits*) und nachfolgend zur Endozytose in frühe Endosomen (Czekay et al., 2003). Die Inaktivierung der Integrine durch MIA könnte ein Signal in die Zelle sein diese vermehrt zu endozytieren und für weitere Fortbewegung der Zelle am vorderen Rand (= *leading edge*) bereit zu stellen.

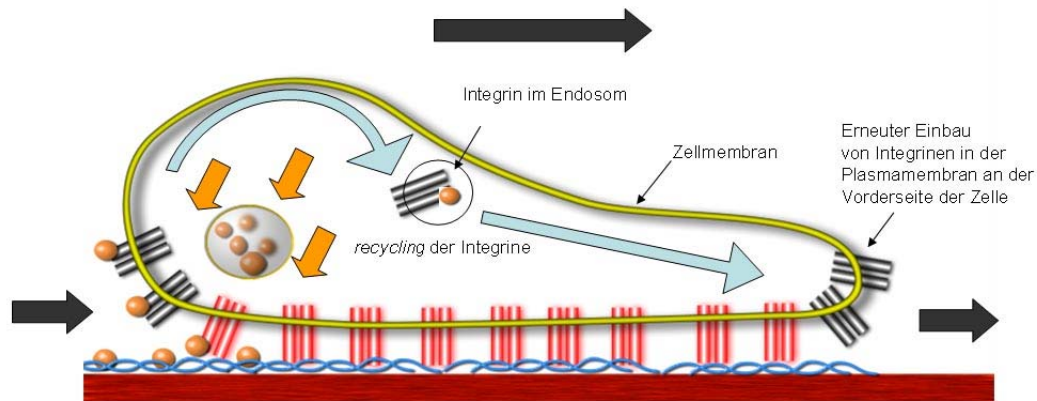


Abbildung 5-3

**Hypothese des Effekts von MIA auf migrierende Zellen** (Legende wie Abbildung 5-2). MIA bindet am hinteren Teil der Zelle an aktivierte Integrine und inaktiviert diese. Dadurch "markiert" es die Integrine für die Endozytose und das *Recycling*. Die Integrine werden somit schneller in den vorderen Bereich der wandernden Zelle in die Plasmamembran transloziert. Dadurch erhöht sich die Migrationsfähigkeit der Zellen.

In der Literatur wird auch eine Modulation der Expression der Matrixmetalloproteinasen 2 und 7 (MMP) durch alpha5 beta1 Integrine beobachtet (Mitra et al., 2003; Belveau et al., 2000). Diese MMPs sind in der Lage die Matrix der Basalmembran zu degradieren. Durch die gezielte Inaktivierung der Integrine durch MIA wäre hier auch spezifische Herauf/Herabregulierung von MMPs in bestimmten Phasen der Tumورprogression durch MIA denkbar.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Signalkaskade von Integrinen zu ERK1/2 auf mögliche veränderte Aktivitäten von beteiligten Signalmolekülen untersucht (siehe auch Kapitel 2.5.1). Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf FAK und SHC gelegt. Über die Beeinflussung von MIA dieser Proteine im malignen Melanom kann jedoch keine definierte Aussage getroffen werden. In keiner der untersuchten Melanomzelllinien zeigte sich phosphoryliertes SHC, obwohl SHC als Gesamtprotein detektiert wurde. Dies kann auf eine konstitutive Unterdrückung dieses Signalweges in Melanomzelllinien hinweisen. Da aber bekannt ist, dass Integrin alpha5 beta1 über SHC und nicht über FAK Signale in die Zelle leitet (Wary et al., 1996), würde ein nicht-aktiver SHC-Signalweg bedeuten, dass dieses Integrin in Melanomzellen über andere Signalwege wirkt. Womöglich geschieht dies über die Verbindung von Wachstumsfaktorrezeptoren. Kuwada et al. beschreibt, dass Integrin alpha5 beta1 via EGFR die fibronektinabhängige Proliferation von Epithelzellen

vermittelt (Kuwada et al., 2000). Die Bindung von MIA an Integrin alpha5 beta1 und dessen Deaktivierung könnte ein zusätzlicher Mechanismus sein die Proliferation der Zellen zu verringern. Die Untersuchung des Einflusses von MIA auf FAK ließ ebenfalls wenige Rückschlüsse zu. Es ist bekannt, dass FAK in Melanomzellen konstitutiv aktiv ist (Kahana et al., 2002). Denkbar wäre eine transiente Blockierung dieses Signalweges durch MIA und dadurch eine kurzzeitige Umordnung beziehungsweise Auflösung der fokalen Kontakte, was wiederum die Ablösung der Zelle vom Substrat positiv beeinflussen könnte.

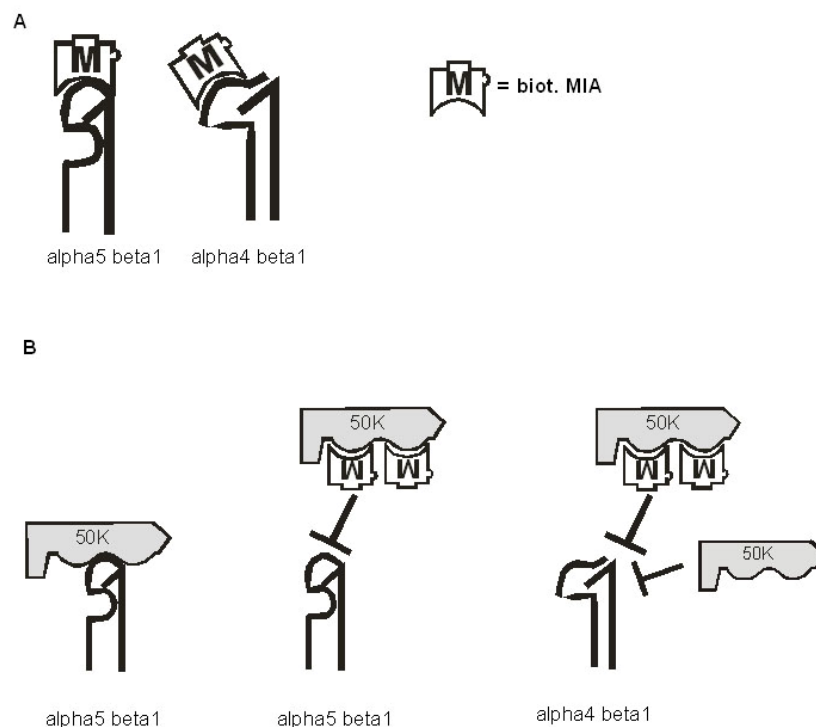
In nicht-neoplastischem Gewebe wird MIA zu Beginn der Chondrozytenentwicklung und während der gesamten Knorpelentwicklung exprimiert. Welche Rolle MIA in Chondrozyten spielt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. MIA-defiziente Mäuse zeigen eine große Variation in der Dichte und des Durchmessers von Kollagenfibrillen im Gelenksknorpel. Im Gegensatz zu MIA exprimierendem Knorpelgewebe weist das Kollagengerüst der defizienten Mäuse außerdem einen äußerst ungeordneten strukturellen Aufbau auf (Moser et al., 2002). Dies bedeutet, dass MIA eine Rolle in der Ausrichtung, Anordnung und Organisation der Kollagenfibrillen spielen könnte. Im Knorpel spielen mechanische Kräfte eine wichtige Rolle bei der Homöostase und Aufrechterhaltung des harten Gewebes. Bei Über- oder Unterbelastung von Knorpelgelenken kann dies zu Krankheiten wie Osteoporose oder Osteoarthritis führen (Brandt et al., 1991). Integrine sind auch bekannt als Rezeptoren, die physikalische Kräfte über die Plasmamembran in Form von chemischen Signalen innerhalb der Zelle weiterleiten (Katsumi et al., 2004). Die Expression von alpha5 beta1 wird bei mechanischem Stress im Knorpelgewebe nach 6 Stunden signifikant erhöht. Lucchinetti et al. (2004) beschreiben, dass trotz weitergehender mechanischer Krafteinwirkung für weitere 18 Stunden, die Expression der Integrinuntereinheit alpha5 wieder sank. Nach weiteren 24 Stunden ohne Krafteinwirkung war die Konzentration von alpha5 wieder auf normalem Niveau. Diese Experimente weisen auf eine direkte Verbindung der Integrinkonzentration auf der Chondrozytenoberfläche und der Einwirkung von mechanischer Kraft hin. Neidhart et al. (2000) beschrieben bei Marathonläufern eine Erhöhung der Serumkonzentration von MIA innerhalb 24 Stunden nach einem Lauf von 42 Km. Hierbei wird MIA als Marker dargestellt, der ein Hinweis auf einen erhöhten Stoffwechsel in Gelenken ist. Die in dieser Arbeit



nachgewiesene Bindung von MIA an Integrin alpha5 beta1 könnte in diesem Zusammenhang als Negativregulator der Signalweiterleitung der Integrine beziehungsweise der Expression von Integrin alpha5 beta1 sein. Durch Blockierung des Signalweges könnte es den Zellen möglich sein die mit Krafteinwirkung einhergehenden Umordnungen des Zytoskeletts und ihrer Matrix wieder rückgängig zu machen. Es wurde festgestellt, dass in rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis, psoriatischer Arthritis und HLA B27-assoziiierter Oligoarthritis die MIA Konzentration im Serum erhöht ist (Bosserhoff und Büttner 2003). Interessanterweise wurde von Ostergaard et al. (1998) gezeigt, dass in osteoarthritischem Knorpelgewebe sowohl die Integrine alpha4 beta1 als auch alpha5 beta1 exprimiert werden, also diejenigen Integrine an die auch MIA bindet. Verschiedene Arbeitsgruppen haben demonstriert, dass sich bei Arthritis Fibronektinfragmente und/oder Kollagenfragmente, verursacht durch mechanisch induzierten Schaden, ansammeln (Xie et al., 1992; Jennings et al., 2001). Diese Fragmente könnten zur Chondrolyse, Matrixdegradation der Chondrozyten, oder zur Veränderung des Chondrozytenstoffwechsels führen, wobei Integrine dabei als Rezeptoren dienen und katabole Signale in die Zelle weiterleiten. (Homandberg et al., 2002). Die Expression von MIA in diesen Zellen könnte als Gegenreaktion zur malignen Veränderung der Chondrozyten fungieren. Die Maskierung der Integrinbindestellen der Fibronektinfragmente durch MIA blockiert die Interaktion der Matrixfragmente mit den Integrinen. Zudem wurde in vorliegender Arbeit gezeigt, dass MIA an aktivierte Integrine bindet und diese deaktiviert. Demnach wäre ein weiterer Gegenschnitt zur Degradierung der Chondrozyten die Inaktivierung der Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 durch MIA und somit die Blockade des matrixdegradierenden Signalweges in die Zelle. Die dauerhaft belasteten Chondrozyten könnten somit, durch vermehrte Sezernierung von MIA, einer Lockerung und Umordnung ihrer Matrix entgegenwirken.

Um die Bindung von MIA an die Integrine alpha4 beta1 und alpha5 beta1 noch weiter zu untersuchen, wurden Verdrängungsexperimente mit den Fibronektinfragmenten 50K und H/120 durchgeführt (siehe schematische Darstellung Abbildung 4-22). Es ist bekannt, dass das Fragment 50K eine RGD-Bindestelle besitzt und spezifisch an alpha5 beta1 Integrine bindet. H/120

bindet dagegen über das IIICS-Segmentes (*connecting segment*), spezifisch an alpha4 beta1 {Mostafavi-Pour et al., 2003}. Wie erwartet verdrängt das 50K Fragment MIA dosisabhängig von Integrin alpha5 beta1. Die Konkurrenz zeigte sich aber auch mit Integrin alpha4 beta1, jedoch zu einem geringeren Ausmaß (siehe Abbildung 4-23 A). Dies könnte daran liegen, dass MIA das 50K Fragment an zwei verschiedenen Stellen bindet (FN6 und der RGD-Stelle) {Bosserhoff et al., 2003}. Das 50K Fragment könnte MIA somit abfangen und dessen Bindung an die Integrine verhindern (siehe Abbildung 5-4 A/B).



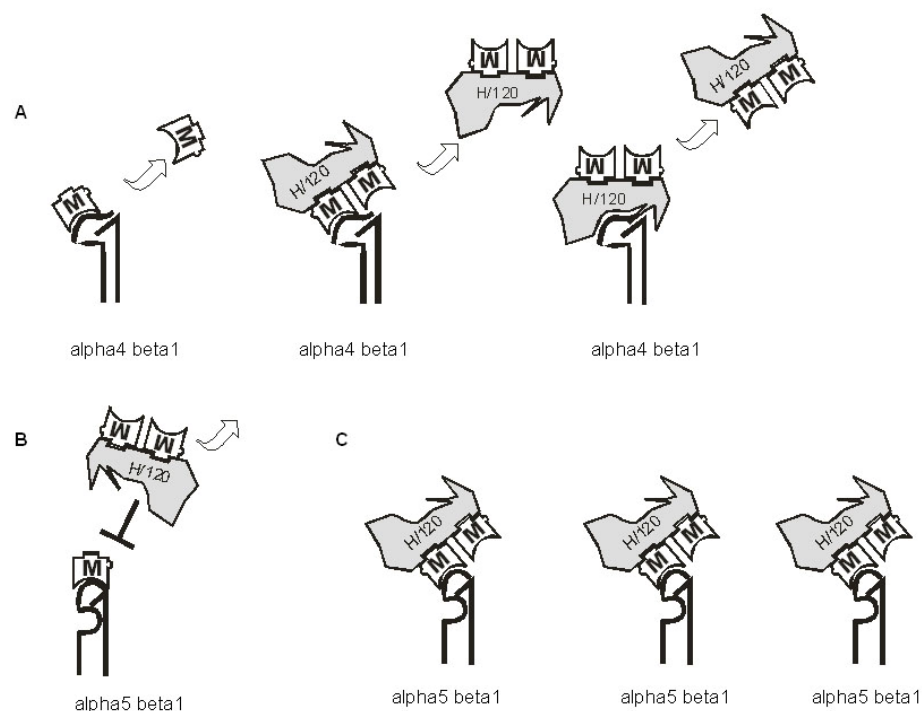
**Abbildung 5-4**

**Schematische Darstellung der Verdrängung von biot. MIA an alpha4 beta1 und alpha5 beta1 durch 50K**

**A** MIA-Bindung an die Integrine alpha5 beta1 und alpha4 beta1. **B** Das Fibronektinfragment 50K bindet MIA an zwei verschiedenen Stellen. Außerdem bindet 50K spezifisch an alpha5 beta1, jedoch nicht an alpha4 beta1. Die im ELISA sichtbare Verdrängungsreaktion an alpha4 beta1 kann trotzdem dadurch auftreten, dass 50K die Bindungsstelle von MIA an alpha4 beta1 maskiert und MIA abfängt. Die Folge davon wäre, dass MIA nicht an das Integrin binden kann.

Zusätzlich deutet das auch auf die Möglichkeit hin, dass das 50K Fragment entweder an dieselbe Stelle bindet mit der MIA an die Integrine bindet oder 50K das MIA-Integrin Bindungssepitop blockiert. Andernfalls wäre es MIA möglich an die Integrine trotz einer Interaktion mit 50K zu binden. Interessanterweise zeigten die Experimente mit niedrigeren Konzentrationen des Fragments H/120 keine Verdrängung von MIA von den Integrinen alpha4 beta1 und alpha5 beta1.

In höheren Konzentrationen zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung der MIA-Bindung an die Integrine, hauptsächlich an alpha5 beta1. In früheren Studien wurde gezeigt, dass MIA an verschiedene Bereiche des Fragments H/120 binden kann (FN14 und das IIICS-Segment) {Bosserhoff et al., 2003}. Möglicherweise bindet ein Komplex aus H/120 und mehreren MIA-Proteinen an das Integrin alpha5 beta1. Wenn H/120 an MIA bindet, ohne dass die MIA-Integrinbindestelle blockiert wird, könnte MIA auch indirekt die Bindung an Integrin alpha4 beta1 fördern. Daher könnte man die Hypothese aufstellen, dass das 50K Fragment die Stelle des MIA Proteins blockiert, mit der es an Integrine bindet, wohingegen H/120 dieses Epitop nicht beeinflusst.



**Abbildung 5-5**

**Schematische Darstellung der Bindung des H/120-biot.MIA Komplexes an alpha4 beta1 und alpha5 beta1.**

**A** Das Fibronektinfragment H/120 fördert die Bindung von biot. MIA an alpha4 beta1. Wahrscheinlich maskiert H/120 die Bindungsstelle von MIA an alpha4 beta1 nicht. Auf diese Weise kann biot. MIA im Komplex mit H/120 direkt mit alpha4 beta1 interagieren. Auch H/120 ist in der Lage direkt an alpha4 beta1 zu binden. Weil beide Moleküle direkt mit alpha4 beta1 Integrin interagieren, könnte es zu einem leichten Verdrängungseffekt kommen. **B** Der leichte Verdrängungseffekt von MIA bei einer niedrigeren Konzentration von H/120 an alpha5 beta1 könnte durch die Blockierung des H/120-biot.MIA Komplexes an der Integrinbindestelle durch biot. MIA erfolgen. **C** Die Verstärkung des MIA-Signals an alpha5 beta1 durch Zugabe höherer Konzentrationen von H/120 könnte dadurch erfolgen, dass alle Bindungsstellen durch die direkte Bindung von biot. MIA im Komplex mit H/120 abgesättigt werden. Die Signalstärke entspricht bei der Bindung von jeweils zwei Molekülen biot.MIA an H/120 genau der doppelten Signalstärke, wie bei der Bindung von nur einem Molekül biot. MIA an alpha5 beta1.

In einem weiteren Experiment wurden erst Fibronektinfragmente ausplattiert, anschließend mit MIA inkubiert und, als dritter Schritt, lösliche Integrine im Überschuss zugegeben. Hier zeigte sich starke Konkurrenz von MIA mit löslichem Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  an 50K und Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  an H/120. Nahezu keine Verdrängung von MIA zeigte sich bei Inkubation von  $\alpha 4 \beta 1$  an 50K oder  $\alpha 5 \beta 1$  an H/120. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass  $\alpha 4 \beta 1$  nicht an 50K und  $\alpha 5 \beta 1$  nicht an H/120 binden kann. Ein geringer Anteil von MIA könnte jedoch von  $\alpha 4 \beta 1$  oder  $\alpha 5 \beta 1$  abgefangen werden.

Integrine  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  sind wichtig für das Entstehen des malignen Melanoms (Übersichtsartikel siehe Kuphal, Bauer und Bosserhoff 2005). Es wurde dargestellt, dass die Konzentrationen beider Integrine in primären und metastasierenden Melanomen erhöht sind (Moretti et al., 1993; Hartstein et al., 1997; Nikkola et al., 2004). Weiterhin wird die Expression der  $\alpha 4$  Untereinheit mit der Akkumulation von Zellen in vom Ursprungsort entfernten Geweben in Verbindung gebracht (Holzmann et al., 1998). Neben der Funktion Integrinbindungsstellen an Extrazellulärmatrixproteinen zu maskieren, ist es MIA also möglich beide Fibronektinrezeptoren ( $\alpha 4 \beta 1$  und  $\alpha 5 \beta 1$ ) zu binden und Regulation der Signalwege, ausgehend von den Integrinen, über die MAP-Kinase ERK 1/2, zu ermöglichen. Auf diese Weise ist es den Zellen dann möglich, sich von ihrer Unterlage zu lösen und auszuwandern.

Weiterführende Studien werden zeigen, welche Effekte die Bindung von MIA an spezifische Integrine hat. Zusätzlich muss geklärt werden, was die weiteren Interaktionspartner sind und inwieweit MIA Signalkaskaden der Zellen beeinflussen kann, welche an der Invasionsfähigkeit der Melanomzellen beteiligt sind. Kollaborationsstudien mit biotinyliertem MIA könnten Aufschluss darüber geben, ob MIA tatsächlich am frühen endosomalen Transport der Integrine beteiligt ist. Immunhistochemische Färbungen und weiterführende molekularbiologische Analysen von Zellen werden zudem zeigen, ob und inwieweit MIA an Zytoskelett- oder Matrixorganisation der malignen Zellen beteiligt ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Morii, E., Kim, D., Ogihara, H., Jippo, T., Ito, A., Lee, Y. M., and Kitamura, Y.; *Involvement of mi-transcription factor in expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor in cultured mast cells of mice*. J Immunol. 164(2): 855-860 **(2000)**.
- Ahrens, T., Sleeman, J. P., Schempp, C. M., Howells, N., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., and Simon, J. C.; *Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid*. Oncogene. 20(26): 3399-3408 **(2001)**.
- Aoki, H. and Moro, O.; *Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R)*. Life Sci. 20;71(18): 2171-2179 **(2002)**.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. L.; *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins*. Pharmacol.Rev. 50(2): 197-263 **(1998)**.
- Ariel MM, *Is the beauty mark a mark of beauty or a potentially dangerous cancer?* In: Malignant melanoma, (Ariel, M, ed.) New York:Appleton-Century-Crofts, 3-8 **(1981)**:
- Arteaga, C. L.; *Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia*. Semin.Oncol. 29(5 Suppl 14): 3-9 **(2002)**.
- Barazi, H. O., Li, Z., Cashel, J. A., Krutzsch, H. C., Annis, D. S., Mosher, D. F., and Roberts, D. D.; *Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion*. J Biol.Chem. 277(45): 42859-42866 **(2002)**.

- Barberis, L., Wary, K. K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G., and Giancotti, F. G.; *Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK*. J Biol.Chem. 275(47): 36532-36540 **(2000)**.
- Bergeron, E., Basak, A., Decroly, E., and Seidah, N. G.; *Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage*. Biochem.J. 373(Pt 2): 475-484 **(2003)**.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van, de, V, Cornelisse, C., and van Roy, F.; *E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers*. EMBO J. 14(24): 6107-6115 **(1995)**.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Strumane, K., de Leeuw, W. J., Nollet, F., van Roy, F., and Cornelisse, C.; *E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain*. Oncogene. 13(9): 1919-1925 **(1996)**.
- Bi, X., Lynch, G., Zhou, J., and Gall, C. M.; *Polarized distribution of alpha5 integrin in dendrites of hippocampal and cortical neurons*. J Comp Neurol. 435(2): 184-193 **(2001)**.
- Blanco-Arias, P., Sargent, C. A., and Affara, N. A.; *Protocadherin X (PCDHX) and Y (PCDHY) genes; multiple mRNA isoforms encoding variant signal peptides and cytoplasmic domains*. Mamm.Genome. 15(1): 41-52 **(2004)**.
- Blesch, A., Bosserhoff, A. K., Apfel, R., Behl, C., Hessdoerfer, B., Schmitt, A., Jachimczak, P., Lottspeich, F., Buettner, R., and Bogdahn, U.; *Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA*. Cancer Res. 54(21): 5695-5701 **(1994)**.
- Bodey, B., Bodey, B., Jr., Groger, A. M., Luck, J. V., Siegel, S. E., Taylor, C. R., and Kaiser, H. E.; *Clinical and prognostic significance of the expression*

*of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas.* Anticancer Res. 17(2B): 1319-1330 **(1997)**.

Bogdahn, U., Weber, H., Zapf, J., Dunisch, G., Lobering, H. G., and Mertens, H. G.; *Therapy of malignant brain tumors: comparison of the in vitro activities of vidarabin-monophosphate, BCNU and 5-fluorouracil.* Acta Neurol.Scand. 75(1): 28-36 **(1987)**.

Bogdahn, U., Apfel, R., Hahn, M., Gerlach, M., Behl, C., Hoppe, J., and Martin, R.; *Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma.* Cancer Res. 49(19): 5358-5363 **(1989)**.

Bosserhoff, A. K., Hein, R., Bogdahn, U., and Buettner, R.; *Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA.* J Biol.Chem. 271(1): 490-495 **(1996)**.

Bosserhoff, A. K., Kondo, S., Moser, M., Dietz, U. H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Buettner, R., and Sandell, L. J.; *Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma.* Dev.Dyn. 208(4): 516-525 **(1997)**.

Bosserhoff, A. K., Kaufmann, M., Kaluza, B., Bartke, I., Zirngibl, H., Hein, R., Stolz, W., and Buettner, R.; *Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma.* Cancer Res. 57(15): 3149-3153 **(1997)**.

Bosserhoff, A. K., Golob, M., Buettner, R., Landthaler, M., and Hein, R.; *[MIA ("melanoma inhibitory activity"). Biological functions and clinical relevance in malignant melanoma]*. Hautarzt. 49(10): 762-769 **(1998)**.

Bosserhoff, A. K. and Buettner, R.; *Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity).* Histol.Histopathol. 17(1): 289-300 **(2002)**.

- Bosserhoff, A. K., Stoll, R., Sleeman, J. P., Bataille, F., Buettner, R., and Holak, T. A.; *Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity*. Lab Invest. 83(11): 1583-1594 **(2003)**.
- Bosserhoff, A. K. and Buettner, R.; *Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation*. Biomaterials. 24(19): 3229-3234 **(2003)**.
- Brabant, G., Hoang-Vu, C., Behrends, J., Cetin, Y., Potter, E., Dumont, J. E., and Maenhaut, C.; *Regulation of the cell-cell adhesion protein, E-cadherin, in dog and human thyrocytes in vitro*. Endocrinology. 136(7): 3113-3119 **(1995)**.
- Bracke, M. E., Van Roy, F. M., and Mareel, M. M.; *The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis*. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 213(Pt 1): 123-161 **(1996)**.
- Bradley, R. S., Cowin, P., and Brown, A. M.; *Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion*. J Cell Biol. 123(6 Pt 2): 1857-1865 **(1993)**.
- Brakebusch, C. and Fassler, R.; *The integrin-actin connection, an eternal love affair*. EMBO J. 22(10): 2324-2333 **(2003)**.
- Brandt, K. D.; *Animal models: insights into osteoarthritis (OA) provided by the cruciate-deficient dog*. Br.J Rheumatol. 30 Suppl 1:5-9.5-9 **(1991)**.
- Brieher, W. M., Yap, A. S., and Gumbiner, B. M.; *Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin*. J Cell Biol. 135(2): 487-496 **(1996)**.
- Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K.; *Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases*. Mol.Cell Biol. 15(2): 954-963 **(1995)**.



- Chalmers, I. J., Hofler, H., and Atkinson, M. J.; *Mapping of a cadherin gene cluster to a region of chromosome 5 subject to frequent allelic loss in carcinoma*. Genomics. 57(1): 160-163 **(1999)**.
- Chalmers, I. J., Aubele, M., Hartmann, E., Braungart, E., Werner, M., Hofler, H., and Atkinson, M. J.; *Mapping the chromosome 16 cadherin gene cluster to a minimal deleted region in ductal breast cancer*. Cancer Genet.Cytogenet. 126(1): 39-44 **(2001)**.
- Chen, B. H., Tzen, J. T., Bresnick, A. R., and Chen, H. C.; *Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells*. J Biol.Chem. 277(37): 33857-33863 **(2002)**.
- Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., and Guan, J. L.; *Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin*. J Biol.Chem. 270(28): 16995-16999 **(1995)**.
- Christofori, G. and Semb, H.; *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends Biochem.Sci. 24(2): 73-76 **(1999)**.
- Chun, D., Gall, C. M., Bi, X., and Lynch, G.; *Evidence that integrins contribute to multiple stages in the consolidation of long term potentiation in rat hippocampus*. Neuroscience. 105(4): 815-829 **(2001)**.
- Coats J, *On a case of multiple melanotic sarcoma with remarks on the mode of growth and extension of such tumours*. Glasg Med J. 24: 92-97 **(1885)**.
- Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H., and Parsons, J. T.; *Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK*. Mol.Cell Biol. 14(1): 147-155 **(1994)**.
- Cobb, M. H., Hepler, J. E., Cheng, M., and Robbins, D.; *The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2*. Semin.Cancer Biol. 5(4): 261-268 **(1994)**.

- Cowin, P., Kapprell, H. P., Franke, W. W., Tamkun, J., and Hynes, R. O.; *Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions*. Cell. 46(7): 1063-1073 **(1986)**.
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A., and Loskutoff, D. J.; *Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins*. J Cell Biol. 160(5): 781-791 **(2003)**.
- Dai, D. L., Makretsov, N., Campos, E. I., Huang, C., Zhou, Y., Huntsman, D., Martinka, M., and Li, G.; *Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival*. Clin.Cancer Res. 9(12): 4409-4414 **(2003)**.
- Daniel, J. M. and Reynolds, A. B.; *Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function*. Bioessays. 19(10): 883-891 **(1997)**.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A.; *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. 417(6892): 949-954 **(2002)**.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S.; *Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase*. Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 95(19): 11211-11216 **(1998)**.

- Dietz, U. H. and Sandell, L. J.; *Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis*. J Biol.Chem. 271(6): 3311-3316 **(1996)**.
- Dong, J., Phelps, R. G., Qiao, R., Yao, S., Benard, O., Ronai, Z., and Aaronson, S. A.; *BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma*. Cancer Res. 63(14): 3883-3885 **(2003)**.
- Dorsky, R. I., Itoh, M., Moon, R. T., and Chitnis, A.; *Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain*. Development. 130(9): 1937-1947 **(2003)**.
- Du, J., Miller, A. J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., and Fisher, D. E.; *MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma*. Am.J Pathol. 163(1): 333-343 **(2003)**.
- Elshaw, S. R., Sisley, K., Cross, N., Murray, A. K., MacNeil, S. M., Wagner, M., Nichols, C. E., and Rennie, I. G.; *A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of alpha1beta1, alpha4beta1 and alpha6beta1 integrins*. Br.J Ophthalmol. 85(6): 732-738 **(2001)**.
- Elworthy, S., Lister, J. A., Carney, T. J., Raible, D. W., and Kelsh, R. N.; *Transcriptional regulation of mitfa accounts for the sox10 requirement in zebrafish melanophore development*. Development. 130(12): 2809-2818 **(2003)**.
- Englaro, W., Bertolotto, C., Busca, R., Brunet, A., Pages, G., Ortonne, J. P., and Ballotti, R.; *Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation*. J Biol.Chem. 273(16): 9966-9970 **(1998)**.
- Feltes, C. M., Kudo, A., Blaschuk, O., and Byers, S. W.; *An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion*. Cancer Res. 62(22): 6688-6697 **(2002)**.

- Ferguson, M. A. and Williams, A. F.; *Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures*. Annu.Rev.Biochem. 57: 285-320 **(1988)**.
- Friedl, P., Brocker, E. B., and Zanker, K. S.; *Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells*. Cell Adhes.Commun. 6(2-3): 225-236 **(1998)**.
- Friedl, P., Zanker, K. S., and Brocker, E. B.; *Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function*. Microsc.Res Tech. 43(5): 369-378 **(1998)**.
- Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M., and Leonard, W. J.; *Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation*. Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 93(5): 2077-2082 **(1996)**.
- Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P. Y.; *Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase*. J Cell Biol. 134(3): 793-799 **(1996)**.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K.; *Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin*. J Biol.Chem. 274(37): 26044-26050 **(1999)**.
- Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P., and Gumbiner, B. M.; *Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling*. J Cell Biol. 128(5): 959-968 **(1995)**.
- Galibert, M. D., Yavuzer, U., Dexter, T. J., and Goding, C. R.; *Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter*. J Biol.Chem. 274(38): 26894-26900 **(1999)**.

- Garofalo, A., Chirivi, R. G., Foglieni, C., Pigott, R., Mortarini, R., Martin-Padura, I., Anichini, A., Gearing, A. J., Sanchez-Madrid, F., Dejana, E., and .; *Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases*. Cancer Res. 55(2): 414-419 **(1995)**.
- Glover, T. W. and Stein, C. K.; *Chromosome breakage and recombination at fragile sites*. Am.J Hum.Genet. 43(3): 265-273 **(1988)**.
- Glover, T. W., Coyle-Morris, J. F., Li, F. P., Brown, R. S., Berger, C. S., Gemmill, R. M., and Hecht, F.; *Translocation t(3;8)(p14.2;q24.1) in renal cell carcinoma affects expression of the common fragile site at 3p14(FRA3B) in lymphocytes*. Cancer Genet.Cytogenet. 31(1): 69-73 **(1988)**.
- Gordon-Thomson, C., Mason, R. S., and Moore, G. P.; *Regulation of epidermal growth factor receptor expression in human melanocytes*. Exp.Dermatol. 10(5): 321-328 **(2001)**.
- Gotoh, N., Toyoda, M., and Shibuya, M.; *Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation*. Mol.Cell Biol. 17(4): 1824-1831 **(1997)**.
- Guinebault, C., Payrastre, B., Racaud-Sultan, C., Mazarguil, H., Breton, M., Mauco, G., Plantavid, M., and Chap, H.; *Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase*. J Cell Biol. 129(3): 831-842 **(1995)**.
- Gumbiner, B. M.; *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell. 84(3): 345-357 **(1996)**.
- Gumbiner, B. M.; *Regulation of cadherin adhesive activity*. J Cell Biol. 148(3): 399-404 **(2000)**.

- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R.; *Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation*. Development. 121(11): 3529-3537 **(1995)**.
- Hajra, K. M. and Fearon, E. R.; *Cadherin and catenin alterations in human cancer*. Genes Chromosomes.Cancer. 34(3): 255-268 **(2002)**.
- Hangan, D., Morris, V. L., Boeters, L., von Ballestrem, C., Uniyal, S., and Chan, B. M.; *An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver*. Cancer Res. 57(17): 3812-3817 **(1997)**.
- Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppelino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., and Dedhar, S.; *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase*. Nature. 379(6560): 91-96 **(1996)**.
- Hartstein, M. E., Grove, A. S., Jr., and Woog, J. J.; *The role of the integrin family of adhesion molecules in the development of tumors metastatic to the orbit*. Ophthal.Plast.Reconstr.Surg. 13(4): 227-238 **(1997)**.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R., and Seftor, R. E.; *Molecular plasticity of human melanoma cells*. Oncogene. 22(20): 3070-3075 **(2003)**.
- Herlyn, M. and Satyamoorthy, K.; *Activated ras. Yet another player in melanoma?* Am.J Pathol. 149(3): 739-744 **(1996)**.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J., and Nelson, W. J.; *Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways*. Trends Biochem.Sci. 19(12): 538-542 **(1994)**.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J., and Nelson, W. J.; *Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly*. J Cell Biol. 125(6): 1327-1340 **(1994)**.

- Holzmann, B., Gossler, U., and Bittner, M.; *alpha 4 integrins and tumor metastasis*. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 231: 125-141 **(1998)**.
- Homandberg, G. A., Costa, V., and Wen, C.; *Fibronectin fragments active in chondrocytic chondrolysis can be chemically cross-linked to the alpha5 integrin receptor subunit*. Osteoarthritis.Cartilage. 10(12): 938-949 **(2002)**.
- Homandberg, G. A., Costa, V., Ummadi, V., and Pichika, R.; *Antisense oligonucleotides to the integrin receptor subunit alpha(5) decrease fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis*. Osteoarthritis.Cartilage. 10(5): 381-393 **(2002)**.
- Howe, A. K., Aplin, A. E., and Juliano, R. L.; *Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences*. Curr.Opin.Genet.Dev. 12(1): 30-35 **(2002)**.
- Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Herlyn, M.; *Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas*. J Investig.Dermatol.Symp.Proc. 1(2): 188-194 **(1996)**.
- Hsu, M. Y., Meier, F., and Herlyn, M.; *Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host*. Differentiation. 70(9-10): 522-536 **(2002)**.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J.; *E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton*. J Cell Biol. 127(6 Pt 2): 2061-2069 **(1994)**.
- Humphries, M. J.; *Monoclonal antibodies as probes of integrin priming and activation*. Biochem.Soc.Trans. 32(Pt3): 407-411 **(2004)**.
- Hyduk, S. J., Oh, J., Xiao, H., Chen, M., and Cybulsky, M. I.; *Paxillin selectively associates with constitutive and chemoattractant-induced high-affinity*

- alpha4beta1 integrins: implications for integrin signaling.* Blood. 104(9): 2818-2824 **(2004)**.
- Hynes, R. O.; *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.* Cell. 110(6): 673-687 **(2002)** .
- Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A.; *Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion.* J Cell Biol. 144(6): 1311-1322 **(1999)**.
- Islam, S., Kim, J. B., Trendel, J., Wheelock, M. J., and Johnson, K. R.; *Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion.* J Cell Biochem. 78(1): 141-150 **(2000)**.
- Jang, J. H.; *Identification and characterization of soluble isoform of fibroblast growth factor receptor 3 in human SaOS-2 osteosarcoma cells.* Biochem.Biophys.Res Commun. 292(2): 378-382 **(2002)**.
- Jennings, L., Wu, L., King, K. B., Hammerle, H., Cs-Szabo, G., and Mollenhauer, J.; *The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes.* Connect.Tissue Res. 42(1): 71-86 **(2001)**.
- Johnson, J. P.; *Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma.* Cancer Metastasis Rev. 18(3): 345-357 **(1999)**.
- Jost, M., Huggett, T. M., Kari, C., and Rodeck, U.; *Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway.* Mol.Biol.Cell. 12(5): 1519-1527 **(2001)**.
- Jost, M., Huggett, T. M., Kari, C., Boise, L. H., and Rodeck, U.; *Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway.* J Biol.Chem. 276(9): 6320-6326 **(2001)**.



- Juliano, R. L., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A., and Aplin, A.; *Integrin regulation of cell signalling and motility* . Biochem.Soc.Trans. 32(Pt3): 443-446 **(2004)**.
- Kahana, O., Micksche, M., Witz, I. P., and Yron, I.; *The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma*. Oncogene. 21(25): 3969-3977 **(2002)**.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M., and Nakagawa, M.; *Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases*. Curr.Opin.Cell Biol. 11(5): 591-596 **(1999)**.
- Kamaraju, A. K., Bertolotto, C., Chebath, J., and Revel, M.; *Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling*. J Biol.Chem. 277(17): 15132-15141 **(2002)**.
- Karadag, M., Tunca, B., Cecener, G., Egeli, U., Ozyardimci, N., Ege, E., and Gozu, O.; *Chromosomal fragile sites and relationship between genetic predisposition to small cell lung cancer*. Teratog.Carcinog.Mutagen. 22(1): 31-40 **(2002)**.
- Kari, C., Chan, T. O., Rocha, de Quadros, and Rodeck, U.; *Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer: apoptosis takes center stage*. Cancer Res. 63(1): 1-5 **(2003)**.
- Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E., and Schwartz, M. A.; *Integrins in mechanotransduction*. J Biol.Chem. 279(13): 12001-12004 **(2004)**.
- Kawaguchi, J., Takeshita, S., Kashima, T., Imai, T., Machinami, R., and Kudo, A.; *Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11*. J Bone Miner.Res. 14(5): 764-775 **(1999)**.

- Kawano, R., Matsuo, N., Tanaka, H., Nasu, M., Yoshioka, H., and Shirabe, K.; *Identification and characterization of a soluble cadherin-7 isoform produced by alternative splicing*. J Biol.Chem. 277(49): 47679-47685 **(2002)**.
- Kefford, R., Bishop, J. N., Tucker, M., Bressac-de Paillerets, B., Bianchi-Scarra, G., Bergman, W., Goldstein, A., Puig, S., Mackie, R., Elder, D., Hansson, J., Hayward, N., Hogg, D., and Olsson, H.; *Genetic testing for melanoma*. Lancet Oncol. 3(11): 653-654 **(2002)**.
- Kemler, R.; *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion*. Trends Genet. 9(9): 317-321 **(1993)**.
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., Ballotti, R., and Bertolotto, C.; *Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis*. J Biol.Chem. 277(37): 33690-33697 **(2002)**.
- Khwaja, A. and Downward, J.; *Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells*. J Cell Biol. 139(4): 1017-1023 **(1997)**.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P. H., and Downward, J.; *Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway*. EMBO J. 16(10): 2783-2793 **(1997)**.
- Kim, K. Y., Rhim, T., Choi, I., and Kim, S. S.; *N-acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity*. J Biol.Chem. 276(44): 40591-40598 **(2001)**.
- Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J.; *Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin*. J Cell Biol. 130(1): 67-77 **(1995)**.

- Knudsen, K. A. and Soler, A. P.; *Cadherin-mediated cell-cell interactions*. Methods Mol.Biol. 137:409-40.409-440 **(2000)**.
- Kraehn, G. M., Scharlt, M., and Peter, R. U.; *Human malignant melanoma. A genetic disease?* Cancer. 75(6): 1228-1237 **(1995)**.
- Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A. K.; *Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma*. Oncogene. 23(52): 8509-8519 **(2004)**.
- Kuphal, S., Bauer, R., and Bosserhoff, A. K.; *Integrin signaling in malignant melanoma*. Cancer Metastasis Rev. 24(2): 195-222 **(2005)**.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., and Kaibuchi, K.; *Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion*. Science. 281(5378): 832-835 **(1998)**.
- Kuwada, S. K. and Li, X.; *Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation*. Mol.Biol.Cell. 11(7): 2485-2496 **(2000)**.
- Lainez, B., Fernandez-Real, J. M., Romero, X., Esplugues, E., Canete, J. D., Ricart, W., and Engel, P.; *Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2*. Int.Immunol. 16(1): 169-177 **(2004)**.
- Laennec RTH, *Sur les melanoses*. Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris, Premier serie 1804-1808 (Tome Premier) :24-6 **(1806)**.
- Lancaster, HO, Nelson, J, *Sunlight as a cause of melanoma: a clinical survey*. Med J Aust. 1:452-456 **(1957)**.
- Latil, A., Cussenot, O., Fournier, G., Driouch, K., and Lidereau, R.; *Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma:*

*identification of three independent regions. Cancer Res. 57(6): 1058-1062 (1997).*

Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S., and Falus, A.; *Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. Cytokine. 12(6): 547-554 (2000).*

Lewis, J. E., Jensen, P. J., and Wheelock, M. J.; *Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. J Invest Dermatol. 102(6): 870-877 (1994).*

Li, G., Schaidt, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M.; *Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. Oncogene. 20(56): 8125-8135 (2001).*

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M.; *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer Res. 61(9): 3819-3825 (2001).*

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M.; *Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. Crit Rev.Oral Biol.Med. 13(1): 62-70 (2002).*

Lucchinetti, E., Bhargava, M. M., and Torzilli, P. A.; *The effect of mechanical load on integrin subunits alpha5 and beta1 in chondrocytes from mature and immature cartilage explants. Cell Tissue Res. 315(3): 385-391 (2004).*

Luzi, L., Confalonieri, S., Di Fiore, P. P., and Pelicci, P. G.; *Evolution of Shc functions from nematode to human. Curr.Opin.Genet.Dev. 10(6): 668-674 (2000).*

Madara, J. L.; *Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? Cell.;53(4): 497-498 (1988).*

- Mangelsdorf, M., Ried, K., Woollatt, E., Dayan, S., Eyre, H., Finnis, M., Hobson, L., Nancarrow, J., Venter, D., Baker, E., and Richards, R. I.; *Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer*. Cancer Res. 60(6): 1683-1689 **(2000)**.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., and Robakis, N. K.; *A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. EMBO J. 21(8): 1948-1956 **(2002)**.
- Marani, M., Hancock, D., Lopes, R., Tenev, T., Downward, J., and Lemoine, N. R.; *Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells*. Oncogene. 23(14): 2431-2441 **(2004)**.
- Marshall, J. F., Rutherford, D. C., Happerfield, L., Hanby, A., McCartney, A. C., Newton-Bishop, J., and Hart, I. R.; *Comparative analysis of integrins in vitro and in vivo in uveal and cutaneous melanomas*. Br.J Cancer. 77(4): 522-529 **(1998)**.
- Mattei, S., Colombo, M. P., Melani, C., Silvani, A., Parmiani, G., and Herlyn, M.; *Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes*. Int.J Cancer. 56(6): 853-857 **(1994)**.
- Mehta, R. J., Diefenbach, B., Brown, A., Cullen, E., Jonczyk, A., Gussow, D., Luckenbach, G. A., and Goodman, S. L.; *Transmembrane-truncated alphavbeta3 integrin retains high affinity for ligand binding: evidence for an 'inside-out' suppressor?* Biochem.J. 330(Pt 2): 861-869 **(1998)**.
- Melki, J. R., Vincent, P. C., Brown, R. D., and Clark, S. J.; *Hypermethylation of E-cadherin in leukemia*. Blood. 95(10): 3208-3213 **(2000)**.
- Meyskens, F. L., Jr., Farmer, P. J., and Anton-Culver, H.; *Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk*. Clin.Cancer Res. 10(8): 2581-2583 **(2004)**.

- Mitra, A., Chakrabarti, J., and Chatterjee, A.; *Binding of alpha5 monoclonal antibody to cell surface alpha5beta1 integrin modulates MMP-2 and MMP-7 activity in B16F10 melanoma cells.* J Environ.Pathol.Toxicol.Oncol. 22(3): 167-178 **(2003)**.
- Mooseker, M. S., Bonder, E. M., Conzelman, K. A., Fishkind, D. J., Howe, C. L., and Keller, T. C., III; *Brush border cytoskeleton and integration of cellular functions.* J Cell Biol. 99(1 Pt 2): 104-112 **(1984)**.
- Moretti, S., Martini, L., Berti, E., Pinzi, C., and Giannotti, B.; *Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions.* Melanoma Res. 3(4): 235-239 **(1993)**.
- Morse, H. G. and Moore, G. E.; *Cytogenetic homogeneity in eight independent sites in a case of malignant melanoma.* Cancer Genet.Cytogenet. 69(2): 108-112 **(1993)**.
- Mortarini, R., Gismondi, A., Santoni, A., Parmiani, G., and Anichini, A.; *Role of the alpha 5 beta 1 integrin receptor in the proliferative response of quiescent human melanoma cells to fibronectin.* Cancer Res. 52(16): 4499-4506 **(1992)**.
- Moser, M., Bosserhoff, A. K., Hunziker, E. B., Sandell, L., Fassler, R., and Buettner, R.; *Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice.* Mol.Cell Biol. 22(5): 1438-1445 **(2002)**.
- Mostafavi-Pour, Z., Askari, J. A., Parkinson, S. J., Parker, P. J., Ng, T. T., and Humphries, M. J.; *Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration.* J Cell Biol. 161(1): 155-167 **(2003)**.
- Nagafuchi, A. and Takeichi, M.; *Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain.* EMBO J. 7(12): 3679-3684 **(1988)**.

- Narumiya, S., Abe, Y., Kita, Y., Miyake, K., Nakajima, K., Watanabe, T. X., Oka, Y., Sugiyama, H., Yagita, H., Okumura, K., and .; *Pre-B cells adhere to fibronectin via interactions of integrin alpha 5/alpha V with RGDS as well as of integrin alpha 4 with two distinct V region sequences at its different binding sites*. Int.Immunol. 6(1): 139-147 **(1994)**.
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bartolazzi, A., Cavaliere, R., and Bigotti, A.; *Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the alpha 3/beta 1 heterodimer with tumor progression*. Int.J Cancer. 54(1): 68-72 **(1993)**.
- Nawrocki, B., Polette, M., Van Hengel, J., Tournier, J. M., van Roy, F., and Birembault, P.; *Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas*. Am.J Pathol. 153(5): 1521-1530 **(1998)**.
- Neidhart, M., Muller-Ladner, U., Frey, W., Bosserhoff, A. K., Colombani, P. C., Frey-Rindova, P., Hummel, K. M., Gay, R. E., Hauselmann, H., and Gay, S.; *Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners*. Osteoarthritis.Cartilage. 8(3): 222-229 **(2000)**.
- Nelson, C. M. and Chen, C. S.; *VE-cadherin simultaneously stimulates and inhibits cell proliferation by altering cytoskeletal structure and tension*. J Cell Sci. 116(Pt 17): 3571-3581 **(2003)**.
- Nelson, C. M., Pirone, D. M., Tan, J. L., and Chen, C. S.; *Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA*. Mol.Biol.Cell. 15(6): 2943-2953 **(2004)**.
- Niermann, T., Kern, F., Erne, P., and Resink, T.; *The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins*. Biochem.Biophys.Res Commun. 276(3): 1240-1247 **(2000)**.

- Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Heino, J., and Pyrhonen, S.; *Integrin chains beta1 and alphav as prognostic factors in human metastatic melanoma*. Melanoma Res. 14(1): 29-37 **(2004)**.
- Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E.; *Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions*. J Biol.Chem. 276(26): 23499-23505 **(2001)**.
- Nishimura, E. K., Yoshida, H., Kunisada, T., and Nishikawa, S. I.; *Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification*. Dev.Biol. 215(2): 155-166 **(1999)**.
- Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M., and Mareel, M.; *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci. 114(Pt 1): 111-118 **(2001)**.
- Nollet, F., Berx, G., and van Roy, F.; *The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer*. Mol.Cell Biol.Res Commun. 2(2): 77-85 **(1999)**.
- Norris W. *Case of fungoid disease*. Eding Med Surg J. 16:562-565 **(1820)**.
- Novak, A. and Dedhar, S.; *Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf*. Cell Mol.Life Sci. 56(5-6): 523-537 **(1999)**.
- Ohkubo, T. and Ozawa, M.; *p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity*. J Biol.Chem. 274(30): 21409-21415 **(1999)**.
- Oliveira, C., de Bruin, J., Nabais, S., Ligtenberg, M., Moutinho, C., Nagengast, F. M., Seruca, R., van Krieken, H., and Carneiro, F.; *Intragenic deletion of CDH1 as the inactivating mechanism of the wild-type allele in an HDGC tumour*. Oncogene. 23(12): 2236-2240 **(2004)**.



- Osman, I., Scher, H., Dalbagni, G., Reuter, V., Zhang, Z. F., and Cordon-Cardo, C.; *Chromosome 16 in primary prostate cancer: a microsatellite analysis*. Int.J Cancer. 71(4): 580-584 **(1997)**.
- Ostergaard, K., Salter, D. M., Petersen, J., Bendtzen, K., Hvolris, J., and Andersen, C. B.; *Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads*. Ann Rheum.Dis. 57(5): 303-308 **(1998)**.
- Oyama, T., Kanai, Y., Ochiai, A., Akimoto, S., Oda, T., Yanagihara, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Shibamoto, S., Ito, F., and .; *A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines*. Cancer Res. 54(23): 6282-6287 **(1994)**.
- Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R.; *Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule*. Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 87(11): 4246-4250 **(1990)**.
- Ozawa, M. and Kemler, R.; *The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity*. J Cell Biol. 142(6): 1605-1613 **(1998)**.
- Panizzon, R. G. and Guggisberg, D.; *[Clinical aspects and pathology of melanoma]*. Ther.Umsch. 56(6): 302-308 **(1999)**.
- Pankov, R., Cukierman, E., Clark, K., Matsumoto, K., Hahn, C., Poulin, B., and Yamada, K. M.; *Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A*. J Biol.Chem. 278(20): 18671-18681 **(2003)**.
- Paradies, N. E. and Grunwald, G. B.; *Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated*

*by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function.* J Neurosci.Res. 36(1): 33-45 **(1993)**.

Parish I, *Case of melanosis.* Am J Med Sci. 20:266-268 **(1837)**.

Pasquet, J. M., Noury, M., and Nurden, A. T.; *Evidence that the platelet integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway.* Thromb.Haemost. 88(1): 115-122 **(2002)**.

Paul, A. C., Sheard, P. W., and Duxson, M. J.; *Development of a mammalian series-fibered muscle.* Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol. 278(2): 571-578 **(2004)**.

Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G.; *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.* Nature. 392(6672): 190-193 **(1998)**.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J., and Dedhar, S.; *Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells.* Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 97(7): 3207-3212 **(2000)**.

Persad, S. and Dedhar, S.; *The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression.* Cancer Metastasis Rev. 22(4): 375-384 **(2003)**.

Pfarrer, C., Hirsch, P., Guillomot, M., and Leiser, R.; *Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes.* Placenta. 24(6): 588-597 **(2003)**.

Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A. G., Varnai, A., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K.; *Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail.* J Biol.Chem. 276(27): 24661-24666 **(2001)**.

- Poser, I., Golob, M., Weidner, M., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K., *Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression.* Cancer Res. 62(20):5962-5966 **(2002)**.
- Poser, I., Golob, M., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K., *Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype.* Mol. Cell. Biol. 23(8): 2991-2998 **(2003)**.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A.; *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF.* Nature. 402(6764): 884-888 **(1999)**.
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M., and Ullrich, A.; *Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification.* Breast Cancer Res. 2(3): 184-190 **(2000)**.
- Radeva, G., Petrocelli, T., Behrend, E., Leung-Hagesteijn, C., Filmus, J., Slingerland, J., and Dedhar, S.; *Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression.* J Biol.Chem. 272(21): 13937-13944 **(1997)**.
- Radice, G. L., Ferreira-Cornwell, M. C., Robinson, S. D., Rayburn, H., Chodosh, L. A., Takeichi, M., and Hynes, R. O.; *Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice.* J Cell Biol. 139(4): 1025-1032 **(1997)**.
- Randle, HW, *Suntanning: differences in perceptions throughout history.* Mayo Clin Proc. 72:461-466 **(1997)**.

- Rattner, A., Chen, J., and Nathans, J.; *Proteolytic shedding of the extracellular domain of photoreceptor cadherin. Implications for outer segment assembly.* J Biol.Chem. 279(40): 42202-42210 **(2004)**.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., and Morrow, J. S.; *Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.* Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 92(19): 8813-8817 **(1995)**.
- Rimm, D. L., Sinard, J. H., and Morrow, J. S.; *Reduced alpha-catenin and E-cadherin expression in breast cancer.* Lab Invest. 72(5): 506-512 **(1995)**.
- Sabe, H., Hata, A., Okada, M., Nakagawa, H., and Hanafusa, H.; *Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src.* Proc.Natl.Acad Sci U.S.A. 91(9): 3984-3988 **(1994)** .
- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Yamamoto, H., and Shibahara, S.; *Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway.* Pigment Cell Res. 16(3): 261-265 **(2003)**.
- Sakai, R., Henderson, J. T., O'Bryan, J. P., Elia, A. J., Saxton, T. M., and Pawson, T.; *The mammalian ShcB and ShcC phosphotyrosine docking proteins function in the maturation of sensory and sympathetic neurons.* Neuron. 28(3): 819-833 **(2000)**.
- Sanders, D. S., Blessing, K., Hassan, G. A., Bruton, R., Marsden, J. R., and Jankowski, J.; *Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours.* Mol.Pathol. 52(3): 151-157 **(1999)**.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D., and Herlyn, M.; *Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways.* Cancer Res. 61(19): 7318-7324 **(2001)**.

- Satyamoorthy, K. and Herlyn, M.; *Cellular and molecular biology of human melanoma*. Cancer Biol.Ther. 1(1): 14-17 **(2002)**.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M. R., Brose, M. S., Volpe, P., Weber, B. L., Van Belle, P., Elder, D. E., and Herlyn, M.; *Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation*. Cancer Res. 63(4): 756-759 **(2003)**.
- Schadendorf, D.; *[Gene therapy in malignant melanoma. Interview with D. Schadendorf]*. Hautarzt. 47(12): 962-964 **(1996)**.
- Schaller, M. D.; *Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase*. Biochim.Biophys.Acta. 1540(1): 1-21 **(2001)**.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., and van der, Geer P.; *Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase*. Nature. 372(6508): 786-791 **(1994)**.
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A., and Hunter, T.; *Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins*. Mol.Cell Biol. 17(3): 1702-1713 **(1997)**.
- Seline, P. C., Norris, D. A., Horikawa, T., Fujita, M., Middleton, M. H., and Morelli, J. G.; *Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation*. J Invest Dermatol. 106(6): 1320-1324 **(1996)**.
- Sharpless, E. and Chin, L.; *The INK4a/ARF locus and melanoma*. Oncogene.;22(20): 3092-3098 **(2003)**.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M., and Ito, F.; *Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and*

*epidermal growth factor in human carcinoma cells.* Cell Adhes.Comm. 1(4): 295-305 **(1994)**.

Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O., and Hirohashi, S.; *Molecular cloning of a human Ca<sup>2+</sup>-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues.* J Cell Biol. 109(4 Pt 1): 1787-1794 **(1989)**.

Shinozaki, M., Fujimoto, A., Morton, D. L., and Hoon, D. S.; *Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas.* Clin.Cancer Res. 10(5): 1753-1757 **(2004)**.

Shiozaki, H., Tahara, H., Oka, H., Miyata, M., Kobayashi, K., Tamura, S., Iihara, K., Doki, Y., Hirano, S., Takeichi, M., and .; *Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers.* Am.J Pathol. 139(1): 17-23 **(1991)**.

Silye, R., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Poole, S., van Noorden, S., Batchelor, W., Regele, H., Sega, W., Boesmueller, H., Krausz, T., and Pignatelli, M.; *E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions.* J Pathol. 186(4): 350-355 **(1998)**.

Smith, D. I., Huang, H., and Wang, L.; *Common fragile sites and cancer (review).* Int.J Oncol. 12(1): 187-196 **(1998)**.

Smythe, W. R., Williams, J. P., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M.; *Cadherin and catenin expression in normal human bronchial epithelium and non-small cell lung cancer.* Lung Cancer. 24(3): 157-168 **(1999)**.

Snow H, *Melanotic cancerous disease.* Lancet. 2: 872-874 **(1892)**.

Soengas, M. S. and Lowe, S. W.; *Apoptosis and melanoma chemoresistance.* Oncogene. %19;22(20): 3138-3151 **(2003)**.

- Soler, A. P., Russo, J., Russo, I. H., and Knudsen, K. A.; *Soluble fragment of P-cadherin adhesion protein found in human milk* . J Cell Biochem. 85(1): 180-184 **(2002)**.
- Sprecher, E., Bergman, R., Richard, G., Lurie, R., Shalev, S., Petronius, D., Shalata, A., Anbinder, Y., Leib, R., Perlman, I., Cohen, N., and Szargel, R.; *Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin*. Nat.Genet. 29(2): 134-136 **(2001)**.
- Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S., Engh, R. A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, T. A., and Bosserhoff, A. K.; *The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold*. EMBO J. 20(3): 340-349 **(2001)**.
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., and Cheresch, D. A.; *Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins*. J Cell Biol. 155(3): 459-470 **(2001)**.
- Sugimoto, K., Honda, S., Yamamoto, T., Ueki, T., Monden, M., Kaji, A., Matsumoto, K., and Nakamura, T.; *Molecular cloning and characterization of a newly identified member of the cadherin family, PB-cadherin* . J Biol.Chem. 271(19): 11548-11556 **(1996)**.
- Suzuki, S. T.; *Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily*. J Cell Sci. 109(Pt 11): 2609-2611 **(1996)**.
- Suzuki, S. T.; *Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?* J Cell Biochem. 61(4): 531-542 **(1996)**.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y.; *Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells*. J Cell Biol. 139(4): 1047-1059 **(1997)**.

- Takeichi, M.; *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator*. Science. 251(5000): 1451-1455 **(1991)**.
- Takeichi, M., Watabe, M., Shibamoto, S., Ito, F., Oda, H., Uemura, T., and Shimamura, K.; *Dynamic control of cell-cell adhesion for multicellular organization*. C.R.Acad Sci III. 316(9): 813-821 **(1993)**.
- Tang, A., Eller, M. S., Hara, M., Yaar, M., Hirohashi, S., and Gilchrest, B. A.; *E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro*. J Cell Sci. 107(Pt 4): 983-992 **(1994)**.
- Teixido, J., Parker, C. M., Kassner, P. D., and Hemler, M. E.; *Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage*. J Biol.Chem. 267(3): 1786-1791 **(1992)**.
- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., and Reynolds, A. B.; *Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion*. J Cell Biol. 148(1): 189-202 **(2000)**.
- Tobal, K., Johnson, P. R., Saunders, M. J., Harrison, C. J., and Liu Yin, J. A.; *Detection of CBFB/MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission*. Br.J Haematol. 91(1): 104-108 **(1995)**.
- Tolboom, T. C., Huidekoper, A. L., Kramer, I. M., Pieterman, E., Toes, R. E., and Huizinga, T. W.; *Correlation between expression of CD44 splice variant v8-v9 and invasiveness of fibroblast-like synoviocytes in an in vitro system*. Clin.Exp.Rheumatol. 22(2): 158-164 **(2004)**.
- Trikha, M., Timar, J., Lundy, S. K., Szekeres, K., Cai, Y., Porter, A. T., and Honn, K. V.; *The high affinity alphaIIb beta3 integrin is involved in invasion of human melanoma cells*. Cancer Res. 57(12): 2522-2528 **(1997)**.



- Trikha, M., Zhou, Z., Timar, J., Raso, E., Kennel, M., Emmell, E., and Nakada, M. T.; *Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis*. Cancer Res. 62(10): 2824-2833 **(2002)**.
- Troussard, A. A., Tan, C., Yoganathan, T. N., and Dedhar, S.; *Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner*. Mol.Cell Biol. 19(11): 7420-7427 **(1999)**.
- Tsao, H., Zhang, X., Benoit, E., and Haluska, F. G.; *Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines*. Oncogene. 16(26): 3397-3402 **(1998)**.
- Vajdic, C. M., Hutchins, A. M., Kricker, A., Aitken, J. F., Armstrong, B. K., Hayward, N. K., and Armes, J. E.; *Chromosomal gains and losses in ocular melanoma detected by comparative genomic hybridization in an Australian population-based study*. Cancer Genet.Cytogenet. 144(1): 12-17 **(2003)**.
- Van Belle, P. A., Elenitsas, R., Satyamoorthy, K., Wolfe, J. T., Guerry, D., Schuchter, L., Van Belle, T. J., Albelda, S., Tahin, P., Herlyn, M., and Elder, D. E.; *Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi*. Hum.Pathol. 30(5): 562-567 **(1999)**.
- van der, Flier A. and Sonnenberg, A.; *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res. 305(3): 285-298 **(2001)**.
- van Elsas, A., Zerp, S., van der, Flier S., Kruse-Wolters, M., Vacca, A., Ruiter, D. J., and Schrier, P.; *Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis*. Recent Results Cancer Res. 139: 57-67 **(1995)**.

- van Groningen, J. J., Bloemers, H. P., and Swart, G. W.; *Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display*. Cancer Res. 55(24): 6237-6243 **(1995)**.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., and Giancotti, F. G.; *The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression*. Cell. 87(4): 733-743 **(1996)**.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F. G.; *A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth*. Cell. 94(5): 625-634 **(1998)**.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D., and Takeichi, M.; *alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells*. J Cell Biol. 142(3): 847-857 **(1998)**.
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J. A., and Chapman, H. A.; *A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling*. J Cell Biol. 144(6): 1285-1294 **(1999)**.
- Williams, C. L., Hayes, V. Y., Hummel, A. M., Tarara, J. E., and Halsey, T. J.; *Regulation of E-cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma*. J Cell Biol. 121(3): 643-654 **(1993)**.
- Williams D, quoted in Silvers DN, *On the subject of primary cutaneous melanoma: a historical perspective*. In: Progress in surgical pathology. (eds Fenoglio CM and Wolff M).. New York: Masson, (6) 277-291 **(1982)**.
- Wiltshire, R. N., Dennis, T. R., Sondak, V. K., Meltzer, P. S., and Trent, J. M.; *Application of molecular cytogenetic techniques in a case study of*

- human cutaneous metastatic melanoma*. Cancer Genet.Cytogenet. 131(2): 97-103 **(2001)**.
- Woods, A. J., White, D. P., Caswell, P. T., and Norman, J. C.; *PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions*. EMBO J. 23(13): 2531-2543 **(2004)**.
- Wu, C.; *ILK interactions*. J Cell Sci. 114(Pt 14): 2549-2550 **(2001)**.
- Wu, C. and Dedhar, S.; *Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes*. J Cell Biol. 155(4): 505-510 **(2001)**.
- Xie, D. L., Meyers, R., and Homandberg, G. A.; *Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid*. J Rheumatol. 19(9): 1448-1452 **(1992)**.
- Xu, F. and Zhao, Z. J.; *Cell density regulates tyrosine phosphorylation and localization of focal adhesion kinase*. Exp.Cell Res. 262(1): 49-58 **(2001)**.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S., and Ishigatsubo, Y.; *A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction*. J Cell Biol. 153(6): 1251-1264 **(2001)**.
- Yang, G., Ge, H., Boucher, A., Yu, X., and Li, C.; *Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor*. Mol.Endocrinol. 18(6): 1354-1362 **(2004)**.
- Yap, A. S., Brieher, W. M., Pruschy, M., and Gumbiner, B. M.; *Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function*. Curr.Biol. 7(5): 308-315 **(1997)**.
- Yu, J., Shen, Y., Tong, S., and Kao, F. T.; *Assignment of three human markers in chromosome 21q11 to mouse chromosome 16*. Somat.Cell Mol.Genet. 23(5): 367-370 **(1997)**.

- Yu, S., Mangelsdorf, M., Hewett, D., Hobson, L., Baker, E., Eyre, H. J., Lapsys, N., Le Paslier, D., Doggett, N. A., Sutherland, G. R., and Richards, R. I.; *Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat*. Cell. 88(3): 367-374 **(1997)**.
- Zambruno, G., Marchisio, P. C., Melchiori, A., Bondanza, S., Cancedda, R., and De Luca, M.; *Expression of integrin receptors and their role in adhesion, spreading and migration of normal human melanocytes*. J Cell Sci. 105(Pt 1): 179-190 **(1993)**.
- Ziober, B. L., Chen, Y. Q., Ramos, D. M., Waleh, N., and Kramer, R. H.; *Expression of the alpha7beta1 laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential*. Cell Growth Differ. 10(7): 479-490 **(1999)**.

## 7 Danksagung

Am meisten Dank gebührt meiner Chefin Prof. Dr. Anja Bosserhoff. Ohne Sie wäre diese Arbeit um ein ganzes Stück kürzer. Mit geradezu unbändiger Geduld hörte sie sich so manche meiner chaotischen Hirngespinnste an, zerstückelte sie mit messerscharfem Verstand in Einzelteile und passte sie mit glasklarer Logik der Realität an. Damit war es mir möglich binnen kurzer Zeit ein paar weitere Puzzlestücke zur Melanomforschung hinzuzufügen. Für die herausragende Betreuung, die Tatsache, dass ich angefangen habe, wissenschaftlich zu denken und das alles in brauchbare Experimente umzusetzen, für die Plätzchen ohne Zimt und dafür, mir zu helfen, meine Sätze, obwohl ich finde dass sie in Ordnung sind, nicht zu sehr zu verschachteln, und für das, wahrscheinlich hoffnungslose, Bemühen meine Kommasetzung zu verbessern, vielen vielen Dank!

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt meinem Erstgutachter Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Hilfestellungen und die absolut unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit.

Natürlich bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Hofstädter, weil er es mir möglich gemacht hat an seinem Institut zu promovieren.

Noch einen besonderen Dank verdient "mein" Postdoc Dr. Marion Schuierer. Durch ihren reichen Erfahrungsschatz im Labor und ihr analytisches Denken brachte sie so manche Experimente zum Laufen. Sie war immer für alle Fragen und Hilfestellungen offen und erweiterte mit konstruktiven Diskussionen und anregenden Gesprächen meinen Laborhorizont beträchtlich.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Ina Poser, die mir mit viel Einfühlungsvermögen und wissenschaftlichem Sachverstand zur Seite stand bis sie nach Dresden ging und mich dann meinem Schicksal überließ. Für die vielen positiven Diskussionen im Labor und beim Schlittschuhlaufen, vielen Dank!

Vielen Dank auch an alle meine Kolleginnen und dem Kollegen für die freundschaftliche Laboratmosphäre. Den TAs Susi, Sübulla für ihre Hilfe in so manchen Notlagen. Schaklin, danke, dass du mir gezeigt hast was man im Labor so macht!

Vielen Dank auch an meine Laborgenossin Anne, die mir durch ihre verzweifelten Selbstgespräche vor der Bench vor Augen geführt hat, dass ich nicht allein bin.

Danke, Sabine, Mäx, Caroll, Ulli und Thomas für die richtige Zeit zum richtigen Wort...und umgekehrt.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt haben und meine Ausbildung ermöglicht haben.

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Richard Bauer, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

.....

.....